

Université de Montréal

Polymorphisme du papillomavirus humain de type 52 et lésions du col de l'utérus

par

Aurélie Formentin

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en microbiologie et immunologie

Août, 2012

© Aurélie Formentin, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Polymorphisme du papillomavirus humain de type 52
et lésions du col de l'utérus**

Présenté par :
Aurélié Formentin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Hugo Soudeyns, président-rapporteur
Dr. François Coutlée, directeur de recherche
Dr. Luchino Cohen, membre du jury

RÉSUMÉ

Les papillomavirus humains (VPHs) sont reconnus comme les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus. Notre étude a pour but de décrire le polymorphisme de la région régulatrice virale (LCR) et du gène E6 du VPH52 chez 216 femmes canadiennes avec différents grades de lésion du col et d'établir s'il existe une association entre les variantes décrites et la présence de lésions intraépithéliales de haut-grade (CIN2,3) du col de l'utérus ou de cancer invasif. L'âge (OR 1.1, 95% CI 1.02-1.17, $p=0.005$) fut significativement associé à la présence de cancer invasif. Une variante de la région régulatrice virale, MTL-52-LCR-02, présentant une substitution nucléotidique au niveau du nucléotide 7436, fut aussi associée à la présence de cancer du col de l'utérus ($p=0.015$). Dans une analyse multivariée, après ajustement pour l'âge, l'ethnicité et le site de recrutement, une délétion au niveau du nucléotide 7695 (OR 5.7, 95% CI 1.2-27.9) ainsi qu'une substitution au niveau du nucléotide 7744 (OR 8.3, 95% CI 1.1-61.0) du LCR, et la variante K93R de la protéine E6 (OR 9.5, 95% CI 1.3-68.9) furent associées de façon significative avec la présence de CIN2,3. Ainsi, le polymorphisme du LCR et du gène E6 du VPH52 est associé avec la présence de CIN2,3 et probablement avec celle d'un cancer invasif.

Mots clés : VPH, cancer du col de l'utérus, polymorphisme viral, dysplasie cervicale

ABSTRACT

Human papillomaviruses (HPVs) are the main etiological agents of cervical cancer. Our study aims to describe HPV52 polymorphism in the long control region (LCR) and in the E6 gene, and to investigate the association between LCR and E6 polymorphism and high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2,3) or invasive cervical cancer in 216 canadian women with various grades of cervical disease. Age was significantly associated with cervical cancer (OR 1.1, 95% CI 1.02-1.17, $p=0.005$). The MTL-52-LCR-02 variant, with a nucleotide substitution in the LCR at position 7436, was also associated with cervical cancer. MTL-52-LCR-02 has been identified in 28.6% of women with cervical cancer and in 0.0% of women without cervical cancer or CIN2,3 ($p=0.015$). In a multivariate analysis, after adjusting for age, ethnicity, detection of HPV16 or 18, and study site, a deletion at nucleotide position 7695 (OR 5.7, 95% CI 1.2-27.9), a variation at nucleotide position 7744 (OR 8.3, 95% CI 1.-61.0) in the LCR and the K93R variant of the protein E6 (OR 9.5, 95% CI 1.3-68.9) were associated with CIN2,3. This study confirms that HPV52 polymorphism in the LCR and in the E6 gene is associated with risk of development of CIN2,3 and possibly invasive cancer of the uterine cervix.

Keywords : HPV, cervical cancer, viral polymorphism, cervical dysplasia

Présentation à des congrès scientifiques

Cette étude a été présentée dans le cadre de deux congrès scientifiques :

1) Présentation par affiche

A. Formentin, P. Forest, A. Koushik, H. Richardson, P. Brassard, A. Ferenczy, J. Archambault, E.L. Franco, F. Coutlée. «*Polymorphisme du papillomavirus humain de type 52 (VPH52) et lésions du col utérin*»

14^{ème} Congrès annuel des étudiants et stagiaires du CRCHUM, 13 décembre 2011

2) Présentation par affiche

Aurélie Formentin*, P. Forest, J. Archambault, A. Koushik, H. Richardson, P. Brassard, E.L. Franco, F. Coutlée. «*Polymorphisme du papillomavirus humain de type 52 et lésions du col de l'utérus*»

Journée des étudiants du réseau SIDA/MI du FRSQ, 2 novembre 2012

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
Présentation à des congrès scientifiques	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vii
<i>Revue de littérature</i>	vii
<i>Article scientifique</i>	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
<i>Revue de littérature</i>	ix
<i>Article scientifique</i>	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	x
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
REVUE DE LITTÉRATURE	1
Introduction	2
1. Le Virus du Papillome Humain	4
1.1 Historique de la recherche sur les papillomavirus	4
1.2 Classification des papillomavirus	6
1.3 Structure du virion et organisation génomique	10
1.3.1 Structure du virion	10
1.3.2 Organisation du génome viral	11
<i>a) Protéines précoces</i>	12
<i>b) Protéines structurales</i>	14
<i>c) Région Régulatrice Virale (LCR ou URR)</i>	15
1.4 Entrée des VPHs et cycle de réplication viral	16
1.4.1 Entrée du virus dans la cellule-hôte	16
1.4.2 Cycle de réplication viral	18

1.5	Caractéristiques de l'infection au VPH	20
1.5.1	Spécificité d'espèce	20
1.5.2	Réponse immunitaire de l'hôte face à une infection naturelle au VPH	20
1.5.3	Facteurs de risques pour l'infection aux VPHs	22
2.	Implication des VPHs dans le cancer du col de l'utérus	24
2.1	Notions générales sur le cancer du col de l'utérus	24
2.2	Pathogénèse	26
2.2.1	Progression des lésions	26
2.2.2	Rôle des oncoprotéines E5, E6 et E7 dans la carcinogénèse du col de l'utérus	30
a)	<i>Potentiel oncogène de la protéine E5</i>	30
b)	<i>Coopération entre les deux oncoprotéines E6 et E7 pour la transformation et l'immortalisation cellulaire</i>	31
2.3	Facteurs de risques pour le développement de lésions précancéreuses et de cancer du col de l'utérus	34
2.3.1	Facteurs viraux	34
a)	<i>Persistance de l'infection</i>	34
b)	<i>Intégration du génome viral</i>	35
c)	<i>Charge virale</i>	35
d)	<i>Rôle du polymorphisme génétique</i>	36
2.3.2	Facteurs de l'hôte	36
a)	<i>Ethnicité</i>	36
b)	<i>Âge</i>	37
c)	<i>Prédispositions génétiques</i>	37
2.3.3	Facteurs environnementaux	38
a)	<i>Tabagisme</i>	38
b)	<i>Nombre de grossesses</i>	39
c)	<i>Prise de contraceptifs oraux</i>	39
d)	<i>Présence d'autres infections sexuellement transmissibles (IST)</i>	40
e)	<i>Régime alimentaire</i>	40
2.4	Dépistage et Vaccination	41

2.4.1 Test de dépistage.....	41
2.4.2 Principe de la vaccination.....	41
2.4.3 Recommandation vaccination au Canada.....	42
2.4.4 Résultats de la vaccination.....	42
3. Variantes du VPH.....	44
3.1 Phylogénie des variantes intra-typiques	44
3.2 Variantes de la région régulatrice virale (LCR)	45
3.3 Variantes des oncogènes viraux E6 et E7	46
3.4 Variantes des autres gènes viraux (L1, E2)	48
PROJET DE RECHERCHE	50
Déclaration de l'étudiante.....	51
Hypothèses et Objectifs	52
Article	53
Discussion.....	88
1. Polymorphisme de la région régulatrice virale (LCR)	90
2. Polymorphisme de l'oncogène E6	93
3. Phylogénie et ethnicité.....	95
4. Cofacteurs (âge/tabac/persistance/infections par de multiples types)	96
5. Limitations de l'étude et résolution	97
Conclusion	99
Bibliographie.....	101

LISTE DES FIGURES

Revue de littérature

Figure 1 : Classification des papillomavirus.....6

Source : Bernard, H.-U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., de Villiers, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79.

Figure 2 : Structure de la capside icosaédrique du papillomavirus humain.....10

Source : HPV information, University of Bristol, 2004

http://www.bristol.ac.uk/biochemistry/gaston/HPV/hpv_information.htm

Figure 3 : Schéma de l'organisation génomique du VPH16.....11

Source : Ernoux-Neufcoeur, P., Arafa, M., Delvenne, P., Saussez, S. (2009) Implication des papillomavirus humains dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. *Bulletin du Cancer* 96(10), 941-950.

Figure 4 : Schéma de la région régulatrice virale (LCR) du VPH18.....15

Source : Bouallaga, I. Les papillomavirus et la régulation de la transcription, chapitre IV, <http://www.123bio.net/revues/ibouallaga/14.html>

Figure 5 : Le cycle viral des papillomavirus humain est étroitement lié à la différenciation cellulaire de l'épithélium.....18

Source : Université Catholique Louvain, Initiation à la virologie, Chapitre V.5 Papillomavirus, http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=papillomavirus

Figure 6 : Incidence du cancer du col de l'utérus à travers le monde.....25

Source : Schiffman, M., Castle, P.E. (2005) The Promise of Global Cervical-Cancer Prevention. N. Engl. J. Med. 353(20), 2101-2104.

Figure 7 : Schéma de la zone de transformation.....26

Source : Modifié de Kumar, V., Robbins, S.L., Cotran, R.S. (2005) Basic Pathology, 7ème édition.

Figure 8 : Représentation du développement des lésions au niveau du col utérin.....29

Source : Modifié de Woodman, C.B., Collins, S.I., Young, L.S. (2007) The natural history of cervical HPV infection : unresolved issues. Nature Reviews Cancer 7(1), 11-22.

Figure 9 : Les oncoprotéines virales E6 et E7 interagissent avec des facteurs cellulaires, ce qui mène à la transformation et à l'immortalisation cellulaire.....31

Source : Modifié de Chung, C.H., Gillison, M.L. (2009) Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. Clin Cancer Res. 15(22), 6758-62.

Article scientifique

Figure 1 : HPV52 polymorphism in the LCR and E6

1a) LCR variations (nucleotide positions).....76

1b) E6 variations (nucleotide positions).....78

Figure 2 : Intratype diversity of HPV52 LCR.....79

LISTE DES TABLEAUX

Revue de littérature

Tableau I : Manifestations cliniques associées à différents types de VPHs.....9

Source : *Modifié de* Burd E.M. (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clin. Microbiol. Rev. 16(1), 1-17.

Article scientifique

Tableau I : Demographics of the HPV52-positive women studied in four studies.....72

Tableau II : Association between HPV52 polymorphism and CIN2/3 in 112 women.....74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

aas : Acides aminés

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIN : Anal intraepithelial neoplasia

AP-1 : Activator Protein 1

B

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer

Bcl-2 : B-cell lymphoma/leukemia 2

BPV : Bovine Papillomavirus

C

CBP : CREB-binding protein

CCNI : Comité consultatif national de l'immunisation

Cdc6 : Cell division cycle 6

Cdk : Cyclin dependent kinase

CI : Intervalle de confiance

CIN : Cervical intraepithelial neoplasia

CMH I et II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II

CPA : Cellule présentatrice d'antigènes

CRPV : Cottontail rabbit papillomavirus

E

E2BS : E2 Binding Site

E6AP : E6-associated protein

EGF : Epidermal Growth Factor

H

HLA : Human Leukocyte Antigen

HSIL : High-grade squamous intraepithelial lesion

H (suite)

HR : High-risk

HSPG : Heparan sulfate proteoglycan

HSV : Herpes simplex virus

hTERT : Human telomerase reverse transcriptase

I

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IFN : Interféron

IRF9 : Interferon regulatory factor 9

IRSE : Interferon-responsive sequence element

ISGF3 : Interferon-stimulated gene factor 3

IST : Infection Sexuellement Transmissible

L

LCR : Long control region

LR : Low-risk

LSIL : Low-grade squamous intraepithelial lesion

M

Mcm7 : Minichromosome maintenance 7

MIP-3 alpha : Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha

MZF1 : Myeloid Zinc Finger 1

N

NF1 : Nuclear Factor 1

NFX1 : Nuclear transcription factor, X-box binding 1

NIT2 : Nitrilase family, member 2

nm : Nanomètre

nt : Nucléotide

O

Oct-1 : Octamère-1

ORF : Open reading frame

ori : Origine de réplication virale

P

Pap : Papanicolaou

PEF-1 : Penta-EF-hand domain containing 1

pRb : Protéine du rétinoblastome

pb : Paire de bases

PCR : Polymerase chain reaction

S

Sp1 : Specificity protein 1

SRY : Sex-determining Region of Y chromosome

STAT1 et STAT2 : Signal transducer and activator of transcription 1 and 2

SV40 : Simian virus 40

T

TAP1 et TAP2 : Antigen Peptide Transporter 1 et 2

TFIID : Transcription Factor II D

U

URR : Upstream regulatory region

USF : Upstream Stimulatory Factor

V

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VLP : Virus-like particles

VPH : Virus du papillome humain

Y

YY1 : Ying-Yang 1

Dédicace

Je dédie ce mémoire à mes parents, qui m'ont toujours encouragée dans la réalisation de mes projets, pour leur présence quoi qu'il arrive et pour tout l'amour qu'ils m'apportent. Je le dédie également au reste de ma famille, et notamment à mon frère en lui souhaitant de rencontrer bonheur et succès et ce tout au long de sa vie, ainsi qu'à mes grands-parents pour tout l'intérêt qu'ils ont toujours démontré à l'égard de mes études.

Remerciements

Tout d’abord, je voudrais grandement remercier mon directeur de recherche, le Dr François Coutlée, pour m’avoir accordé une opportunité unique de réaliser ma maîtrise au sein de son laboratoire. Je souhaiterais aussi le remercier, pour sa disponibilité tout au long de mon projet ainsi que pour ses précieux enseignements. Enfin, je voudrais lui exprimer ma gratitude pour toute la compréhension dont il a su faire preuve à mon égard lors des périodes les plus difficiles de ces deux années de maîtrise.

Je tiens à remercier également Pierre Forest, pour m’avoir encadré tout au long de mon projet, pour ses conseils avisés, et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions. Une pensée particulière pour Véronique Legault, ancienne membre du laboratoire, qui a assuré ma formation lors de mon arrivée au laboratoire. Un grand merci à Karine Beauchemin, pour ses conseils et pour le service de séquençage.

Je voudrais tout particulièrement remercier mes collègues et amies, Julie Guenoun, Émilie Comète et Josiane Chagnon-Choquet, pour tout le soutien et l’aide qu’elles ont pu m’apporter durant ma maîtrise, ainsi que pour tous les bons moments passés en leur compagnie, j’ai eu énormément de plaisir à travailler ou étudier avec elles.

Finalement, une pensée pour ma famille et mes amis en France, notamment, Alice, Chloé, Pauline et Julia pour leur présence dans ma vie, et tous les moments de joie partagés malgré la distance.

REVUE DE LITTÉRATURE

Introduction

Depuis leur origine, les papillomavirus ont coévolué avec l'homme ainsi qu'avec d'autres mammifères (ex : lapins, chiens, bovins, etc.) et sauropsides (oiseaux, tortues, etc.) (Bravo et al., 2010). Au niveau mondial, on estime qu'environ 40 à 80% des hommes et des femmes sexuellement actifs contracteront une infection au papillomavirus humain au cours de leur vie (Baseman and Koutsky, 2005; Bravo et al., 2010; Hariri et al., 2011; Syrjanen et al., 1990), ce qui fait du VPH l'infection sexuellement transmissible (IST) la plus fréquente (Trottier and Franco, 2006). De nos jours, plus de 120 types de VPH ont été caractérisés avec des manifestations cliniques diverses. Les pathologies les plus répandues sont les verrues communes de l'épithélium, les verrues plantaires ou encore les verrues génitales, appelées aussi condylomes acuminés (Bernard et al., 2010). Les VPHs sont également les agents étiologiques responsables du cancer du col de l'utérus. En effet, on retrouve dans plus de 99% des lésions du col utérin de l'ADN viral de VPH (Walboomers et al., 1999). Ils sont aussi impliqués dans d'autres types de cancers ano-génitaux tels que les cancers anaux, de la vulve, du vagin et du pénis, ainsi que certains cancers de la sphère oropharyngée et carcinomes cutanés (par exemple : cancer associé à l'épidermodysplasie verruciforme) (Munger, 2002; Trottier and Burchell, 2009).

Mondialement, le cancer du col de l'utérus est le second cancer le plus fréquent chez les femmes (de Freitas et al., 2012). Son incidence plus élevée dans les pays en développement reflète l'absence de programme de dépistage adéquat (Castellsague, 2008; Stern et al., 2001). Les VPHs de type 16 et 18 sont responsables de 70% des cas de cancer du col de l'utérus (Castellsague, 2008), les 30% restants étant causés par les autres types de VPH classifiés à haut-risque oncogénique (HR) dont fait partie le VPH de type 52, qui est celui sur lequel nous avons décidé de baser notre étude.

Le polymorphisme des VPHs permet la caractérisation de variantes intratypiques qui diffèrent du prototype, la première variante décrite du type, par moins de 5% de variation dans les régions non-codantes, dont la région régulatrice virale (LCR),

ou moins de 2% de variation dans les régions codantes (Bernard et al., 2006). Notre étude a pour but de déterminer si des variantes du LCR ou du gène E6 du VPH52 sont associées avec la présence de lésions de haut-grade (CIN2,3) ou de cancer du col de l'utérus. Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire ont permis de montrer l'association entre le polymorphisme génétique du VPH52 et la persistance de l'infection, un marqueur prédictif du développement de lésions de haut-grade (Aho et al., 2004) ainsi que l'association entre le polymorphisme génétique du VPH33 et la présence de lésions précancéreuses de haut-grade (Khouadri et al., 2006).

Mais avant de présenter notre étude, une brève revue de la littérature sera présentée avec un premier chapitre dédié aux généralités sur le VPH en ce qui concerne sa découverte, sa classification, sa structure, son organisation génomique ainsi que son cycle de vie. Un second chapitre sera consacré à l'implication du VPH dans le cancer du col de l'utérus et à l'ensemble des cofacteurs pouvant conduire au cancer, car l'infection par le VPH constitue une cause nécessaire mais n'est pas suffisante pour le développement du cancer du col utérin (Schiffman et al., 2011). Le troisième chapitre portera sur le polymorphisme du VPH, et abordera les variations que l'on peut retrouver dans les différentes régions génomiques du virus.

1. Le Virus du Papillome Humain

1.1 Historique de la recherche sur les papillomavirus

Les manifestations cliniques liées aux papillomavirus sont connues depuis de nombreux siècles. Ainsi durant l'Antiquité, Hippocrate décrit des verrues génitales qu'il nomme alors « condyloma ». Par la suite, Celsius décrira plusieurs types de verrues communes de l'épithélium (Mougin et al., 1997; Syrjanen and Syrjanen, 2008). Plusieurs siècles plus tard, en 1907, Cuiffo et son équipe montreront l'implication d'un virus dans l'apparition des verrues communes après avoir inoculé à des volontaires un extrait de verrues communes filtré de ses cellules (Cuiffo, 1907). En 1933, Shope et al. décrivent la papillomatose cutanée du lapin sauvage causée par le CRPV (Cottontail-Rabbit Papillomavirus) puis Rous et Beard démontrent le potentiel oncogénique de ce virus, qui après avoir été transféré à un lapin sain induit l'apparition de papillomes puis la transformation en carcinome cutané (Rous and Beard, 1935; Shope and Hurst, 1933). En 1954, Barret et ses coéquipiers démontrent que la transmission du virus impliqué dans l'apparition des verrues génitales se fait par voie sexuelle (Barrett et al., 1954). Avant les années 70, il était acquis qu'il n'existait qu'un seul type de VPH qui provoquait des symptômes différents selon le type d'épithélium infecté. Dès 1976, le chercheur Harald zur Hausen et son équipe vont remettre en cause cette idée et mettre en évidence la pluralité des VPHs (Gissmann and zur, 1976; Orth et al., 1977) ainsi qu'émettre l'hypothèse que les VPHs sont les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus (zur Hausen, 1976; zur Hausen, 1977). Cette idée novatrice lui vaudra d'être récompensé par un prix Nobel de médecine en 2009 (Burk et al., 2009). À partir des années 70-80, le développement des techniques de biologie moléculaire va permettre la détection et la caractérisation de nombreux types de VPH. Plusieurs études épidémiologiques vont confirmer l'hypothèse émise par zur Hausen et ainsi mettre en évidence la relation entre l'infection avec un VPH à haut-risque et l'apparition de lésions malignes au niveau du col de l'utérus (Munoz et al., 1992; Schiffman et al., 1993). Ainsi, au cours de leur étude, Dürst et al. vont détecter de l'ADN du VPH de type 16

dans plus de 60 % des biopsies de cancer du col de l'utérus (Durst et al., 1983). Une avancée majeure des années 90 est la découverte des *virus-like particles* (VLPs), qui résultent d'un auto-assemblage de la protéine majeure de la capside L1 *in vitro* (Kirnbauer et al., 1992). Ces VLPs ont des propriétés semblables aux virions naturels, notamment au niveau antigénique, et ont permis la synthèse des vaccins actuellement sur le marché, dont nous reparlerons plus en détail par la suite.

1.2 Classification des papillomavirus

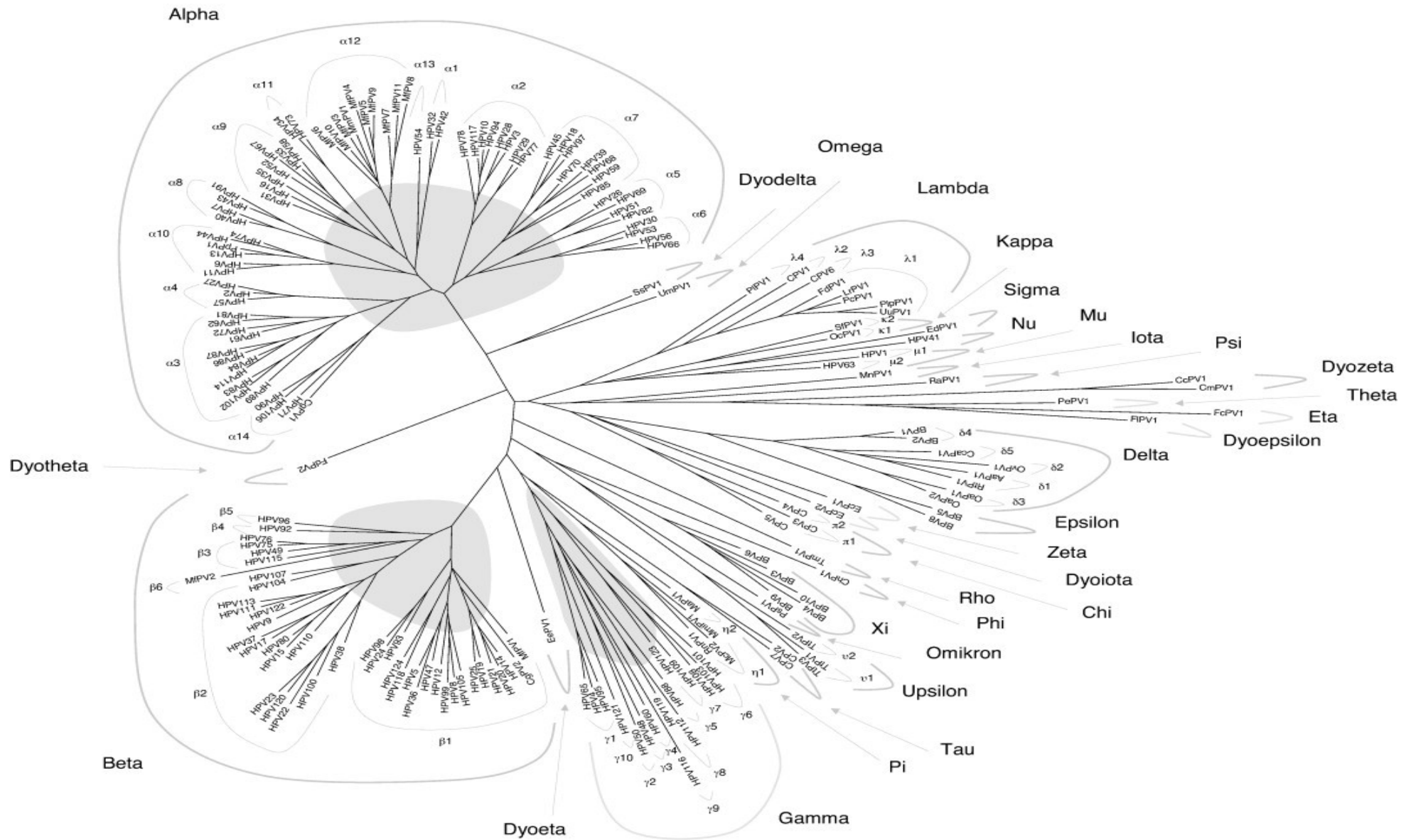


Figure 1 : Classification des papillomavirus. *Les papillomavirus humains sont principalement retrouvés dans le genre α -papillomavirus. Plusieurs VPHs à haut-risque oncogénique, dont les VPH16 et 52, font partie de l'espèce $\alpha 9$.*

Tiré de Bernard, H.-U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., de Villiers, E.-M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology 401, 70-79.

À l'origine, les papillomavirus formaient avec les polyomavirus et les virus vacuolés (ex : SV40) la famille des Papovaviridae, car ces virus partagent des caractéristiques communes. En effet, ce sont des virus non-enveloppés à ADN double-brin circulaire entouré d'une capside icosaédrique. Mais des différences notables existent entre ces virus, dont la taille de la capside et l'organisation génomique (Bernard, 2005). De plus, il n'existe aucune similarité majeure dans leur séquence nucléotidique ou protéique. En 2004, ces virus ont donc été séparés en deux familles distinctes reconnues par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) : les Papillomaviridae et les Polyomaviridae (de Villiers et al., 2004).

La classification des papillomavirus est basée sur leur séquence génomique. Les papillomavirus sont tout d'abord classifiés en genre. On retrouve les VPHs génitaux principalement dans le genre alpha-papillomavirus. Puis, ils sont classés en espèce puis par la suite en type, sous-type et enfin variante. Lors de la Conférence Internationale des Papillomavirus de Québec en 1995, la séquence du gène L1, qui est hautement conservée parmi les papillomavirus, a été désignée pour servir de base pour leur classification (Burk et al., 2009). Ainsi, on définit un nouveau type si le génome de celui-ci est complètement séquencé et si la séquence du gène L1 diffère d'au moins 10% par rapport aux autres types déjà décrits. On définira un sous-type en présence d'une variation de 2-10% dans la séquence du gène L1 et une variante intra-typique en présence de moins de 2% de variation dans les régions codantes ou moins de 5% de variation dans les régions non-codantes, tel que le LCR (Bernard et al., 2006; Burk et al., 2009; de Villiers et al., 2004).

On peut aussi classifier les VPHs selon leur spécificité tissulaire en deux catégories : les VPHs cutanés (par exemple les VPH1 et 2 qui infectent spécifiquement la peau et causent les verrues plantaires ou vulgaires), et les VPHs muqueux, (par exemple le VPH16 qui infecte le col utérin ou les VPH6 et 11 responsables de la papillomatose laryngée) (Alain et al., 2010). On distingue également les VPHs génitaux des VPHs non-génitaux. À ce jour, on recense plus d'une quarantaine de types infectant la muqueuse génitale (Trottier and Burchell, 2009). Les VPHs muqueux peuvent être classifiés selon leur potentiel oncogénique. On dénombre 12 types à haut-risque (HR) (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), 13 types possiblement à haut-risque (VPH26, 30, 34,

53, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85, 97), et 11 à bas-risque (LR) (VPH6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89) (Bouvard et al., 2009; Burk et al., 2009).

Pathologie	Type de VPH
Verrues plantaires	1, 2, 4, 63
Verrues communes	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
Verrues planes	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Autres lésions cutanées (ex : kystes épidermoïdes, cancer du larynx)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermodysplasie verruciforme	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papillomatose respiratoire récurrente	6, 11
Hyperplasie épithéliale focale ou maladie de Heck	13, 32
Papillomes conjonctivaux/carcinomes	6, 11, 16
Condylomes acuminés (verrues génitales)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Néoplasie cervicale intraépithéliale	
Risque non spécifié	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Bas risque	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Haut risque	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Cancer du col de l'utérus	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

L'ordre des types de VPH indique la fréquence relative d'association entre le type et la pathologie.

Les types en gras représentent l'association la plus fréquente avec la pathologie.

Tableau I : Manifestations cliniques associées à différents types de VPHs.

On observe un tropisme cellulaire des VPHs affectant en général soit la peau, soit les muqueuses.

Modifié de Burd E.M. (2003) Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clin. Microbiol. Rev. 16(1), 1-17.

1.3 Structure du virion et organisation génomique

1.3.1 Structure du virion

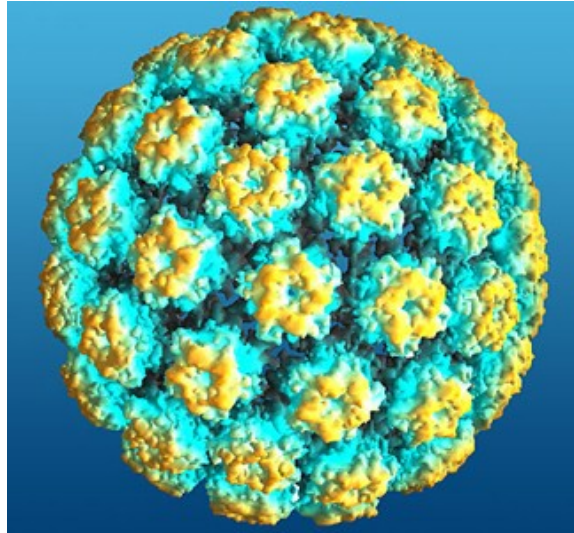


Figure 2 : Structure de la capside icosaédrique du papillomavirus humain.

Ce modèle présente les 72 capsomères formés par la protéine majeure de la capside L1 et la protéine mineure L2.

Tiré de HPV information, University of Bristol, 2004 (Source en ligne)

Les virions du VPH sont de petites particules de structure icosaédrique, composées de 72 capsomères, d'environ 55 nm de diamètre. La capside est formée par la protéine majeure L1 et la protéine mineure L2. Le VPH étant un virus non-enveloppé, il est donc relativement résistant à la chaleur, aux détergents et aux solvants organiques (Monsonogo, 2007; zur Hausen, 2006).

1.3.2 Organisation du génome viral

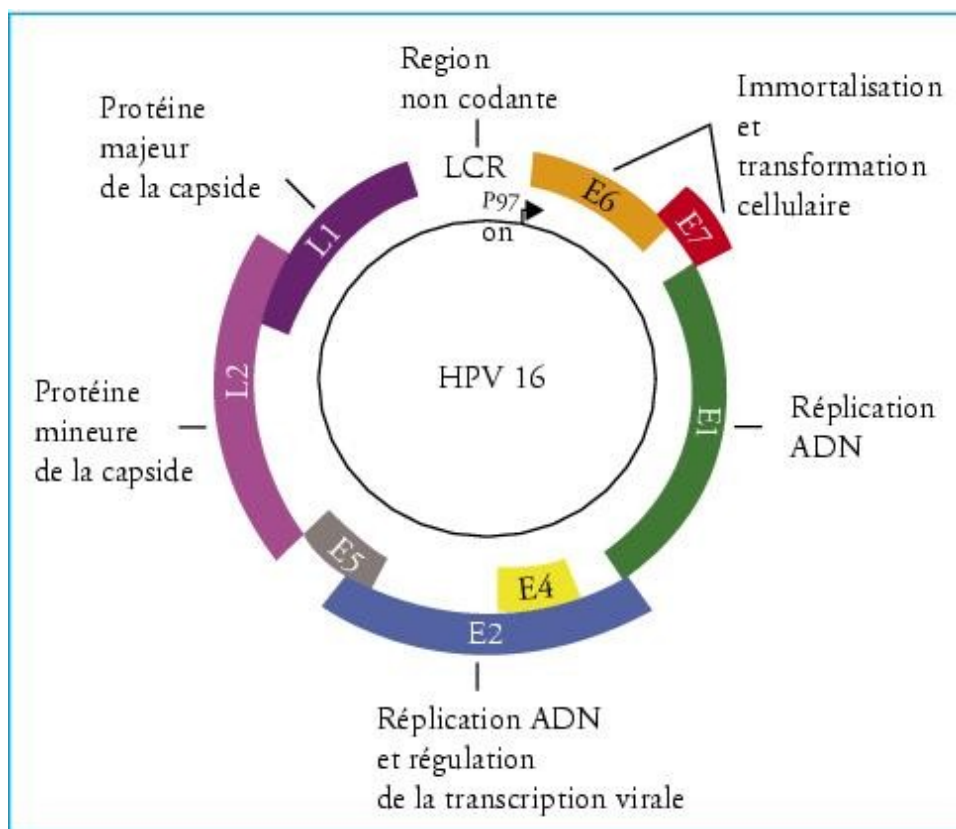


Figure 3 : Schéma de l'organisation génomique du VPH16.

On peut distinguer, les gènes précoces (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8), les gènes tardifs qui codent pour les protéines formant la capside virale (L1 et L2) et la région régulatrice virale (LCR) contenant l'origine de réplication virale ainsi que des sites de liaison pour des facteurs régulant l'activité transcriptionnelle du virus. Les oncoprotéines codées par les gènes E6 et E7 sont impliqués dans la transformation et l'immortalisation cellulaire.

Tiré de Ernoux-Neufcoeur, P., Arafa, M., Delvenne, P., Saussez, S. (2009) Implication des papillomavirus humains dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. Bulletin du Cancer 96(10), 941-950.

Le génome des papillomavirus est un ADN double-brin circulaire d'environ 8000 paires de bases (pb) (Gravitt and Jamshidi, 2005). Il est divisé en deux régions : les gènes précoces ou « early » (gènes E1, E2, E4, E5, E6, E7 et E8) qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions dont la réplication virale, l'oncogénèse et le relâchement des virions, et les gènes tardifs ou « late » (gènes L1 et L2) qui sont les gènes structuraux et vont permettre la formation des virions à la surface de l'épithélium. De plus, on retrouve la région régulatrice virale (URR ou LCR), zone de liaison des facteurs viraux (E2) et cellulaires (YY1, complexe activateur AP-1, Oct-1, etc.) activateurs ou répresseurs de la transcription et du site d'origine de la réplication virale (Monsonogo, 2007).

a) Protéines précoces

La protéine E1 est impliquée avec la protéine E2 dans la réplication virale et ce, dès les phases précoces de l'infection. Ces deux protéines vont former un hétérodimère E1-E2 qui va reconnaître le site d'origine de réplication virale (*ori*) se trouvant dans le LCR (Mougin et al., 1997). La liaison de l'hétérodimère va entraîner l'initiation de la réplication virale. La protéine E1 a aussi une activité hélicase qui permet de séparer les deux brins d'ADN avant l'initiation de la réplication (Yang et al., 1993).

Le gène E2 code pour au moins deux formes de la protéine E2, une forme complète et une forme tronquée au niveau du domaine amino-terminal (Demeret et al., 1997; Mougin et al., 1997). E2 est impliquée avec E1 dans la réplication virale. Elle joue également un rôle dans la répression de la transcription virale. En effet, E2 va réprimer la transcription virale des gènes précoces, notamment des oncogènes E6 et E7, en se liant à ses sites de liaison (E2BS) se trouvant dans le LCR à proximité du promoteur précoce (Demeret et al., 1997; Monsonogo, 2006). La liaison de E2 au site E2BS provoque un encombrement stérique qui va empêcher la liaison au promoteur des gènes précoces de TFIID, un facteur d'initiation de la transcription, ainsi que celle de Sp1, un facteur trans-activateur (Mougin et al., 1997; Tan et al., 1994). E2 joue donc un rôle important dans le contrôle de la carcinogénèse induite par les oncoprotéines E6 et E7. La perte du gène E2 lors de l'intégration du génome viral, dont nous reparlerons en détail par la suite, est considérée comme un événement important de la progression vers le cancer (zur Hausen,

2006). De plus, E2 a une activité pro-apoptotique via son interaction avec la caspase 8 (Blachon and Demeret, 2003). Une autre fonction de la protéine E2 est de permettre l'attachement du génome viral aux chromosomes cellulaires, ce qui est important pour la ségrégation du génome viral lors de la formation des cellules filles au cours de la réplication cellulaire (Lehman and Botchan, 1998; Villa et al., 2002).

Même si le gène E4 est classé comme gène précoce, son expression se fait tardivement au cours du cycle viral. Ainsi, la protéine E4 sera détectée dans les cellules de la couche superficielle de l'épithélium avec les protéines structurales L1 et L2 (Doorbar, 2005). La fonction essentielle de E4 est d'interagir avec les cytokératines, ce qui a pour effet de perturber le cytosquelette de la cellule-hôte facilitant ainsi le relâchement des virions à la surface de l'épithélium (Doorbar et al., 1991). Elle pourrait également jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, notamment en provoquant son arrêt en phase G2 (Davy et al., 2005). Finalement, elle agit au niveau de la réplication virale en interagissant avec les facteurs essentiels à l'initiation de la réplication de l'ADN cellulaire Cdc6 et Mcm7 pour favoriser l'amplification du génome viral (Roberts et al., 2008).

La protéine E8 n'est pas présente pour tous les types de papillomavirus. Le papillomavirus bovin de type 4 (BPV4), le CRPV et quelques types de VPHs génitaux vont la synthétiser (Alain et al., 2010; Pennie et al., 1993). Bien que la fonction de E8 reste encore inconnue, celle-ci est apparentée à E5 (Jackson et al., 1991; Nonnenmacher et al., 2006). Ainsi, E8 démontre des propriétés transformantes dans le cas du BPV4 et est capable de transformer les cellules NIH3T3 après transfection (O'Brien and Campo, 1998). La protéine E8 du CRPV, quant à elle, est nécessaire pour induire la formation des papillomes (verruques cutanées) chez le lapin (Nonnenmacher et al., 2006).

Les autres protéines, soit E5, E6, et E7, ne seront pas décrites dans ce chapitre car elles ont des propriétés transformantes et sont impliquées dans la carcinogénèse du col de l'utérus. Elles seront donc approfondies dans le deuxième chapitre portant sur la relation entre le VPH et le cancer du col de l'utérus.

b) Protéines structurales

La protéine L1 est la protéine majeure de la capside virale. C'est une protéine hautement conservée chez les papillomavirus. Elle se lie au génome viral pour l'encapsider et former des virions infectieux. Elle possède deux signaux de localisation nucléaire qui vont lui permettre d'être transportée au noyau où a lieu l'assemblage des particules virales (Mougin et al., 1997; Zhou et al., 1991). Cette protéine étant reconnue par les récepteurs à la surface cellulaire (voir plus loin), elle permet aussi l'entrée des virions dans une nouvelle cellule-hôte. De plus, elle a la capacité de s'auto-assembler en *virus-like particles* (VLPs) qui sont immunogéniques. La protéine L1 est à la base des vaccins actuellement sur le marché (Kirnbauer et al., 1992).

La protéine L2 est la protéine mineure de la capside, se localisant à l'intérieur de celle-ci contrairement à L1 (Horvath et al., 2010). L2 a de nombreux rôles. Elle facilite notamment l'encapsidation du génome viral par sa capacité à se lier à celui-ci afin de lui permettre de se positionner correctement au sein de la capside virale formée par L1 (Zhou et al., 1994). Elle est aussi impliquée dans la stabilisation de la capside virale grâce à son interaction avec L1 (Finnen et al., 2003; Ishii et al., 2005). Lors de l'établissement de l'infection, L2 est impliquée dans l'échappement des particules virales aux endosomes (Kamper et al., 2006), et assure également le transport du génome viral au noyau de la cellule-hôte pour initier le cycle de réplication et la transcription virale (Day et al., 2004; Florin et al., 2006). L2 peut entrer dans la composition des VLPs en association avec L1. Cependant, aucune différence notable n'a été observée entre la liaison aux cellules-hôtes de ces VLPs et celle des particules composées uniquement de L1 (Volpers et al., 1995).

c) Région Régulatrice Virale (LCR ou URR)

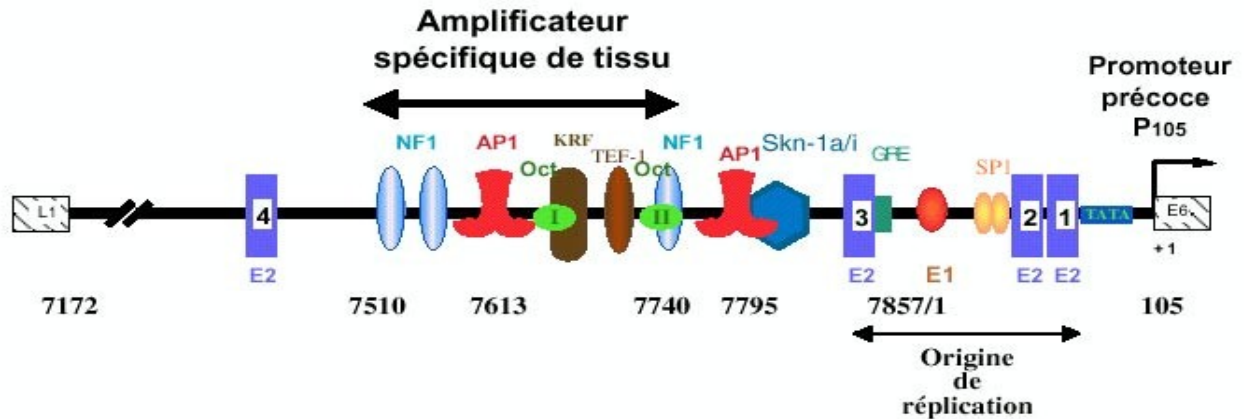


Figure 4 : Schéma de la région régulatrice virale (LCR) du VPH18. On peut distinguer une zone « enhancer » comportant des sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaire tels que YY1, Oct-1, AP-1, etc. ; des sites de liaison pour les protéines E1 et E2 à proximité du promoteur précoce p105 ; l'origine de réplication virale (*ori*).

Tiré de Bouallaga, I. Les papillomavirus et la régulation de la transcription, chapitre IV (Source en ligne).

La région régulatrice virale (LCR) est la région non-codante du génome viral située entre les cadres de lecture (ORF) de L1 et de E6 (O'Connor et al., 1995). Cette région est impliquée dans la régulation de la transcription des gènes viraux, ainsi que dans l'initiation de la réplication virale. Elle comporte une zone de liaison des facteurs de transcription cellulaires, des sites de liaison pour E1 et E2 (E1BS/E2BS) à proximité du promoteur précoce, et l'origine de la réplication virale (*ori*) (Hebner and Laimins, 2006). Les facteurs de transcription cellulaires qui se lient au LCR agissent comme activateurs (AP-1, NF1, Sp1, PEF-1, etc.), ou répresseurs (Oct-1, YY1, etc.) de la transcription des gènes viraux (Apt et al., 1993; Bauknecht et al., 1995; Hoppe-Seyler and Butz, 1992; O'Connor et al., 1996; Sibbet et al., 1995). Il existe un lien entre la régulation de la transcription des oncogènes E6 et E7 par le LCR et la différenciation cellulaire. Ainsi, Kyo et al. ont démontré que l'expression de E6 et de E7 est dépendante du complexe

activateur AP-1 (Fos/Jun) dans les cellules différenciées (Kyo et al., 1997). De plus, la protéine virale E2 réprime la transcription des gènes précoces en se liant à ses sites de liaison E2BS au sein du LCR et en provoquant un encombrement stérique à proximité du promoteur précoce, empêchant la liaison des facteurs d'initiation de la transcription (Tan et al., 1994).

1.4 Entrée des VPHs et cycle de réplication viral

Les VPHs sont des parasites intracellulaires qui infectent les kératinocytes indifférenciés de la couche basale de l'épithélium. Une lésion de l'épithélium va permettre au VPH d'atteindre les cellules de la couche basale (Monsonogo, 2007). Leur cycle viral est dépendant de la différenciation cellulaire. En effet, bien qu'ils infectent dans un premier temps des cellules souches basales, les virions produits seront relâchés par des cellules différenciées à la surface de l'épithélium. En raison du lien entre le cycle viral et la différenciation cellulaire, il est difficile de trouver un modèle d'étude des VPHs en culture cellulaire *in vitro*. Néanmoins, les VLPs ont des caractéristiques semblables aux virions naturels en ce qui concerne la liaison à la cellule-hôte puis à l'entrée dans celle-ci, ce qui a permis de résoudre quelques interrogations sur le cycle de vie des VPHs (Horvath et al., 2010).

1.4.1 Entrée du virus dans la cellule-hôte

Bien que certains des mécanismes menant à l'entrée du virus restent inconnus, d'autres ont pu être élucidés. Ainsi, la liaison du VPH à la cellule-hôte se fait via la protéine majeure de la capsid L1 à des récepteurs très fréquents à la surface cellulaire, les protéoglycanes de type sulfate d'héparane (HSPG) (Selinka et al., 2003). Cette liaison entraîne un changement de conformation au niveau des protéines de la capsid et ferait potentiellement apparaître un domaine de liaison pour un second récepteur plus spécifique que le HSPG (Horvath et al., 2010). L'intégrine $\alpha 6$ a été proposée comme second récepteur par plusieurs équipes de recherche (Evander et al., 1997). La protéine

mineure de la capsid L2 pourrait être impliquée dans l'interaction avec ce second récepteur (Kawana et al., 2001). Pour que L2 puisse interagir avec ce second récepteur, il faut dans un premier temps qu'il y ait clivage par la furine d'un domaine de L2 exposé lors du réarrangement de la capsid virale, qui a lieu suite à la liaison de L1 au HSPG (Day et al., 2008; Richards et al., 2006). Contrairement aux autres virus, le VPH peut rester longtemps à la surface cellulaire avant d'être internalisé (Culp and Christensen, 2004). L'internalisation peut se faire via deux voies différentes selon le type de VPH étudié. L'internalisation des VPH16 et 58 est médiée par les vésicules de clathrine tandis que le VPH31 est internalisé via la voie cavéolaire (Bousarghin et al., 2003).

Après l'internalisation du virus, la perturbation des ponts disulfure de la capsid virale va entraîner la décapsidation et la libération de l'ADN viral afin qu'il puisse être importé, avec L2, dans le noyau de la cellule-hôte (Day et al., 2004; Li et al., 1998). Le virus va ensuite utiliser la machinerie de réplication et de transcription de l'hôte pour compléter son cycle de réplication et sa transcription.

1.4.2 Cycle de réplication viral

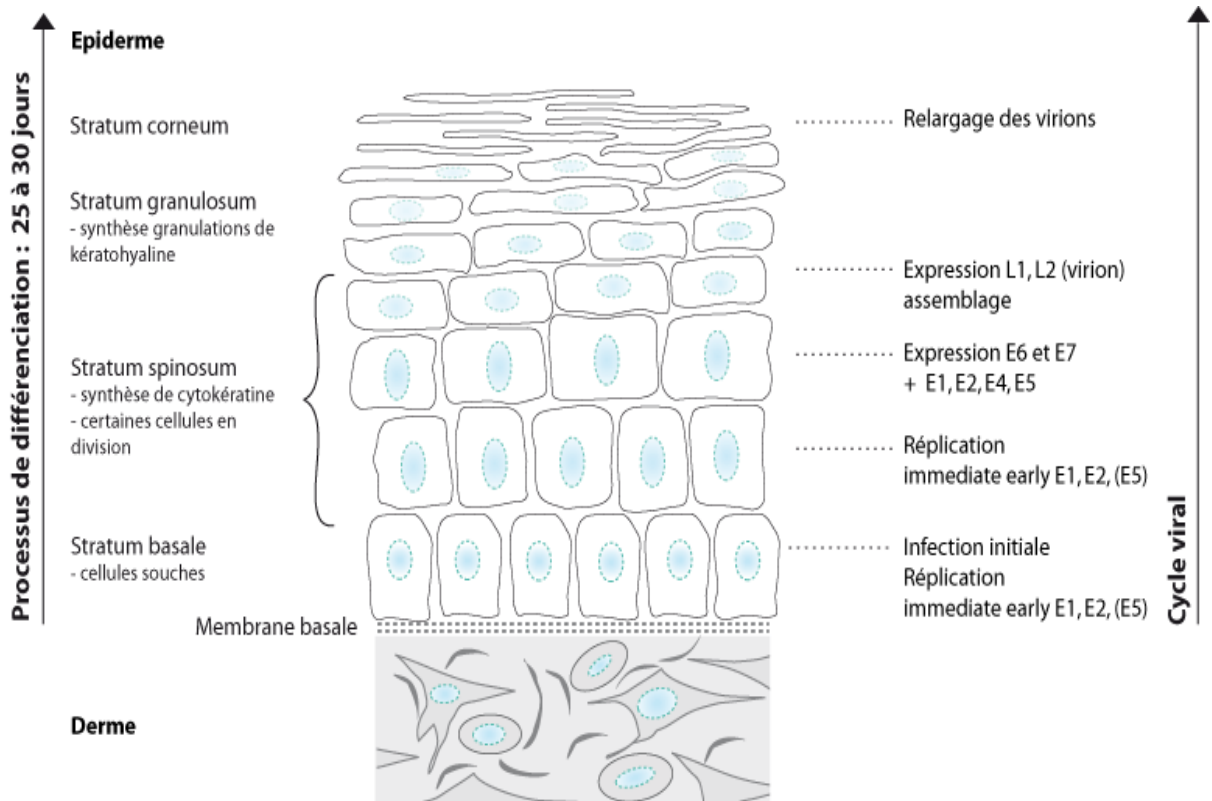


Figure 5: Le cycle viral des papillomavirus humain est étroitement lié à la différenciation cellulaire de l'épithélium. A la suite d'un bris de l'épithélium, le VPH infectera les kératinocytes indifférenciés de la couche basale. Les protéines précoces E1 et E2 vont initier la réplication virale dans ces cellules, puis au fur à mesure de la différenciation cellulaire, il y aura expression des oncoprotéines E5, E6 et E7 puis de la protéine E4 qui intervient dans la maturation du virus. Dans les cellules différenciées à la surface de l'épithélium, on retrouve les protéines structurales L1 et L2 nécessaires à la formation des virions.

Tiré de Université Catholique Louvain, Initiation à la virologie, Chapitre V.5 Papillomavirus (Source en ligne).

Durant les phases initiales de l'infection, il y a expression des protéines précoces E1 et E2 au niveau des cellules de la couche basale. Ces deux protéines vont s'assembler en hétérodimère et permettre l'initiation de la réplication virale en se liant au site *ori*. Elles vont aussi permettre de maintenir le génome du VPH sous forme épisomale à un faible taux de copies par cellule, entre 10 et 200 copies (Doorbar, 2005). Ainsi, on observe une phase de maintenance du génome viral durant laquelle a lieu la ségrégation du génome viral dans les cellules-filles. A cette étape, E2 joue un rôle important en se liant aux chromosomes cellulaires et à l'ADN viral (Lehman and Botchan, 1998).

Les protéines oncogéniques E6 et E7, impliquées dans la prolifération cellulaire anarchique, sont d'abord faiblement exprimées. Leur expression augmente au cours de la différenciation cellulaire et retarde le processus de différenciation cellulaire normal (Doorbar, 2005). E7 va médier l'entrée en phase de réplication de l'ADN (phase S) de la cellule via sa liaison au pRb, une protéine suppressive de tumeur, et au relâchement du facteur de transcription E2F (Wu et al., 1993). Or, la cellule-hôte va empêcher la prolifération cellulaire en empruntant la voie de la mort cellulaire programmée dépendante de p53, qui est également une protéine suppressive de tumeur (White, 1994). E6 intervient alors pour empêcher la cellule d'entrer en apoptose en entraînant la dégradation de p53 par le protéasome (Scheffner et al., 1990).

Après la phase de maintenance du génome viral, il y a une phase d'amplification du génome viral nécessaire à la formation des particules virales infectieuses. Toutes les protéines précoces sont exprimées durant cette phase (Doorbar, 2005). Au niveau des cellules de la couche supérieure de l'épithélium, L1 et L2 vont permettre l'encapsidation du génome viral. Par la suite, les virions formés seront relâchés à la surface de l'épithélium, E4 jouant un rôle dans la perturbation du réseau de cytokératine (Doorbar et al., 1991). Les virions pourront se propager via la desquamation des cellules de l'épithélium (Bryan and Brown, 2001).

1.5 Caractéristiques de l'infection au VPH

Le VPH est l'infection sexuellement transmissible la plus commune. Au Canada, 75% des hommes et des femmes sexuellement actifs souffriront d'au moins une infection au VPH au cours de leur vie (Trottier and Burchell, 2009).

1.5.1 Spécificité d'espèce

Les papillomavirus infectent la majorité des animaux (mammifères, sauropsides), mais on observe une forte spécificité d'espèce (Bravo et al., 2010). On peut citer en exemple le BPV ou le CRPV ou encore celui qui nous intéresse ici, le VPH. Bien qu'il existe peu de cas de transmission inter-espèce, certains papillomavirus peuvent infecter des espèces différentes de leur hôte original, ce qui est le cas notamment du BPV. Ainsi, les BPV1 et 2 sont capables de provoquer des tumeurs bénignes, aussi appelées sarcoïdes, chez les équidés (chevaux, ânes, zèbres, etc.) (Otten et al., 1993; Van et al., 2009). De l'ADN de BPV1 a été retrouvé dans les mouches qui pourrait donc être responsables de la transmission entre équidés (Finlay et al., 2009). Le BPV a aussi un potentiel oncogénique lorsqu'injecté à des hamsters (Robl and Olson, 1968). De plus, dans un cas de papillome cutané chez un chat domestique, on a retrouvé de l'ADN du VPH9 (Munday et al., 2007).

1.5.2 Réponse immunitaire de l'hôte face à une infection naturelle au VPH

Le développement d'une réponse immunitaire efficace joue un rôle important dans la résolution de l'infection au VPH (zur Hausen, 2002). Au niveau du tractus génital féminin, l'acidité vaginale, la présence d'une flore bactérienne ainsi que celle de peptides ayant une activité virucide, les défensines sécrétées par les cellules épithéliales, permettent de réduire la dissémination avant l'apparition de la réponse immunitaire spécifique (Greslin et al., 1998).

Des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), des macrophages résidents et des cellules dendritiques dont les cellules de Langerhans, sont présentes au niveau de la muqueuse du col de l'utérus (Greslin et al., 1998; Monsonego, 2007). Ces cellules expriment à leur surface des molécules du CMH I et CMH II permettant la présentation des antigènes aux cellules du système immunitaire. Les CPA vont soit présenter des particules virales entières fixées à la surface cellulaire par les récepteurs au VPH pour l'activation des cellules B naïves, soit des peptides provenant de la dégradation des virions ou des kératinocytes infectés pour l'activation des cellules T naïves. L'activation des cellules B ou T naïves va se faire au niveau des ganglions lymphatiques (Monsonego, 2006). Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) activés vont alors lyser les kératinocytes infectés en sécrétant de la perforine et des granzymes (Bontkes et al., 1997). La mise en place d'une réponse T efficace est essentielle pour combattre les lésions dues au VPH, et plus particulièrement une réponse T auxiliaire, car ce sont les lymphocytes T CD4+ que l'on retrouve en plus grande proportion dans les lésions en régression (Coleman et al., 1994; Knowles et al., 1996).

Une réponse humorale est aussi activée, via les plasmocytes sécréteurs d'anticorps, mais apparaît moins efficace pour contrer l'infection initiale que la réponse immunitaire via les cellules T (Gravitt and Jamshidi, 2005). Les anticorps sont principalement dirigés contre les épitopes de la capside virale L1 et L2, bien que dans les cas de cancer du col de l'utérus, on retrouve des anticorps dirigés contre les oncogènes E6 et E7 (Bleul et al., 1991; Galloway, 1992). L'immunité humorale s'avère essentielle en cas de réinfection, la présence d'anticorps empêchant le virus de pénétrer dans la cellule (Alain et al., 2010). De plus, la présence d'anticorps neutralisants induits par les vaccins VLP anti-VPH est très efficace pour empêcher l'infection initiale par les VPHs ciblés.

Pour échapper au système immunitaire, le VPH a développé plusieurs stratégies ciblant le mécanisme de présentation des antigènes viraux. Ainsi, le virus abaisse l'expression des molécules du CMH ainsi que celle des molécules de transport antigénique (TAP1 et TAP2), et réduit le nombre de cellules de Langerhans (Ashrafi et al., 2002; Kanodia et al., 2007; Matthews et al., 2003; Vambutas et al., 2001). Les oncoprotéines virales E6 et E7 sont impliquées dans l'inhibition de la transcription du

facteur MIP-3 alpha, nécessaire au recrutement des CPA au site de l'infection (Guess and McCance, 2005). Le VPH est aussi capable d'interférer avec l'IFN-alpha. E7 va empêcher la formation du complexe de transcription ISGF3 activé par l'IFN-alpha. Ce complexe est formé de 3 facteurs de transcription : STAT1, STAT2, p48/IRF9. Or E7 va se lier à p48/IRF9 et inhiber sa translocation au noyau. E6 est aussi capable de diminuer l'expression de STAT1. La formation de ISGF3 étant inhibée, il ne peut pas se fixer à son récepteur dans le noyau (IRSE). Or la liaison de ISGF3 à ISRE permet d'initier la transcription des gènes stimulés par l'IFN-alpha (ISG). E6 et E7 sont donc capables de diminuer l'expression des gènes stimulés par l'IFN-alpha (ISG), qui ont des propriétés antivirales, anti-prolifératives et sont impliqués dans la stimulation du système immunitaire (Kanodia et al., 2007; Nees et al., 2001). De plus, le virus n'est pas libéré de la cellule lors de la lyse cellulaire par les cellules du système immunitaire mais lors de la mort cellulaire programmée de la cellule. Celui-ci reste donc « invisible » au système immunitaire plus longtemps. Un autre mécanisme mis en place par le VPH est le mimétisme moléculaire, les protéines virales étant semblables aux protéines de l'hôte, ce qui permet au VPH d'échapper à la reconnaissance antigénique par les cellules de l'immunité spécifique (Kanodia et al., 2007).

1.5.3 Facteurs de risques pour l'infection aux VPHs

Certains facteurs vont augmenter le risque d'infection par un VPH humain. Plusieurs de ces facteurs sont reliés au comportement sexuel.

- 1) L'âge précoce au début de la vie sexuelle est un élément important de risque. Ceci est en partie dû à l'immaturité du col de l'utérus durant l'adolescence, le rendant plus susceptible à l'infection et aux lésions dues au VPH (Kahn et al., 2002; Moscicki et al., 1989). En effet, la zone de transformation du col est plus étendue chez les adolescentes. Les cellules basales sont directement exposées à l'environnement au niveau de cette zone.
- 2) Le fait d'avoir de nombreux partenaires sexuels augmente le risque d'infection, la possibilité d'être exposé aux VPHs étant considérablement accrue (Burk et al., 1996; Wheeler et al., 1993).

- 3) La prise de contraceptifs oraux, la ménopause et la grossesse altèrent les niveaux hormonaux ainsi que les défenses immunitaires et pourraient rendre plus vulnérable à une infection par le VPH (Beagley and Gockel, 2003; Ley et al., 1991; Negrini et al., 1990).
- 4) L'immunosuppression causée par l'infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou la prise d'immunosuppresseurs après une greffe d'organe augmente le taux de détection du VPH (Palefsky, 1998).
- 5) La présence d'autres infections sexuellement transmissibles (IST) comme la chlamydia peut entraîner une inflammation au niveau du col utérin. L'épithélium altéré serait alors plus vulnérable à une infection par le VPH (Deluca et al., 2011).

L'un des facteurs de risque critique pour l'infection au VPH est l'âge. En effet, on observe que l'infection est très fréquente chez les femmes de moins de 30 ans. La prévalence de l'infection diminue chez les femmes de plus de 30 ans, possiblement suite à l'acquisition d'une immunité spécifique contre le VPH ou à la présence d'infection latente non détectable. Finalement, certains rapportent un second pic d'infection chez les femmes ménopausées, après 45-50 ans, pouvant être dû à la réactivation d'une infection latente à la suite d'un affaiblissement du système immunitaire ou à un changement de comportement sexuel (Baseman and Koutsky, 2005; Herrero et al., 2000). Certaines études associent le tabagisme actuel ou passif avec la présence d'une infection au VPH (Daling et al., 1986; Rohan et al., 1991). L'origine ethnique joue un rôle dans le type de VPH acquis. Ainsi, le VPH16 prédomine dans la plupart des régions du monde mais quelques types de VPHs infectent préférentiellement certaines populations. On peut citer le VPH45, que l'on retrouve plus fréquemment en Afrique, le VPH31 dans les populations nord- et sud-américaines, et les VPH18, 33, 52 et 58 dans les populations asiatiques. Connaître la répartition géographique des types de VPH permettra de mieux sélectionner les types à inclure dans les préparations vaccinales (Munoz et al., 2004).

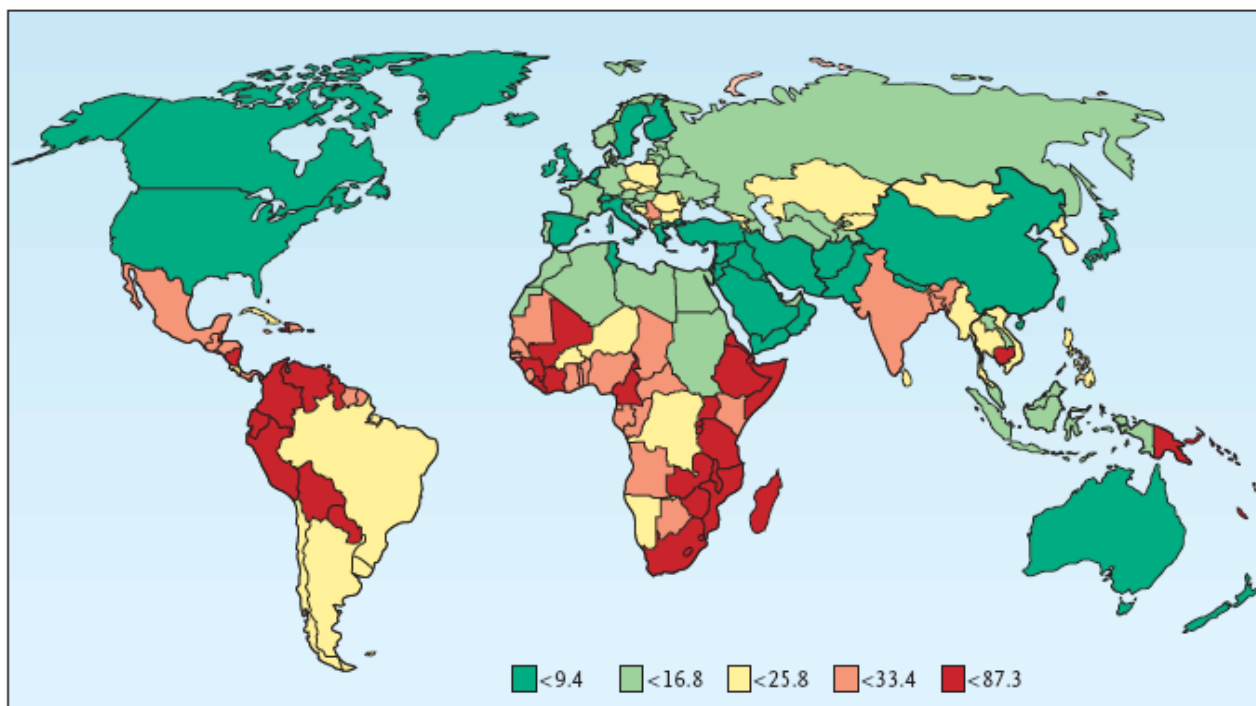
2. Implication des VPHs dans le cancer du col de l'utérus

2.1 Notions générales sur le cancer du col de l'utérus

Les VPHs sont maintenant reconnus comme les agents étiologiques responsables de plus de 99% des cancers du col de l'utérus (Walboomers et al., 1999). Ils sont aussi impliqués dans d'autres cancers ano-génitaux et dans les cancers oropharyngés. Ainsi, 85% des cancers anaux, 50% des cancers de la vulve, 20% des cancers oropharyngés et 10% de ceux du larynx sont attribuables au VPH (Trottier and Franco, 2006). Bien que le VPH soit une IST répandue, puisqu'on estime qu'au niveau mondial environ 40% à 80% des femmes sexuellement actives contracteront une infection au VPH à un moment de leur vie (Baseman and Koutsky, 2005; Gravitt and Jamshidi, 2005; Hariri et al., 2011; Syrjanen et al., 1990), seulement une faible proportion des femmes infectées vont développer un cancer du col de l'utérus. Dans la majorité des cas, l'infection au VPH est transitoire et asymptomatique (Mougin et al., 2009). D'après plusieurs études, le temps moyen de résolution d'une infection par un VPH est de 6 à 12 mois (Franco et al., 1999; Rodriguez et al., 2008). Par contre, la durée de l'infection par un VPH HR peut être plus longue, la résolution de l'infection peut prendre de 14 à 18 mois (Richardson et al., 2003). La plupart des femmes auront éliminé l'infection après 2 ans. Cependant, dans le cas d'une infection persistante par un VPH HR, une lésion précancéreuse peut se développer. C'est dans ces conditions que le risque de développer un cancer augmente. Environ 10% des femmes infectées par un VPH HR vont développer des infections persistantes, dont certaines développeront des lésions précancéreuses de haut-grade (Mougin et al., 2009). Près de 30% des femmes avec une lésion précancéreuse de haut-grade développeront un cancer. Le temps de progression moyen jusqu'au stade cancer est d'environ 10 ans (Alain et al., 2010).

Au niveau mondial, le cancer du col de l'utérus est le second cancer le plus fréquent chez la femme (de Freitas et al., 2012). Il représente environ 13% des cancers chez la femme (Ferlay et al., 2010) et plus de 450 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année (Forouzanfar et al., 2011). En 2010, le cancer du col de l'utérus a été

responsable d'environ 200 000 décès (Forouzanfar et al., 2011). Le cancer du col de l'utérus est beaucoup plus fréquent chez les femmes des pays en développement, puisque 85% des cas de cancer du col utérin sont retrouvés dans ces pays (Ferlay et al., 2010).



Nombre de cas par 100 000 personnes

Figure 6 : Incidence du cancer du col de l'utérus à travers le monde.

Le nombre de cas de cancer du col utérin est accru dans les pays en développement et notamment en Afrique subsaharienne et Amérique du Sud.

Tiré de Schiffman, M., Castle, P.E. (2005) The Promise of Global Cervical Cancer Prevention. N. Engl. J. Med. 353(20), 2101-2104.

Au Canada, le cancer du col de l'utérus est le 10^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme mais il se classe au 3^{ème} rang pour les femmes appartenant à la tranche d'âge de 20 à 49 ans (Santé Canada, 2005). D'après les données estimées pour 2011 au Canada, 1300 nouveaux cas de cancer du col de l'utérus ont été diagnostiqués et le cancer du col utérin est responsable d'environ 350 décès par an (Société canadienne du cancer, 2011).

Dans les pays développés, les taux d'incidence et de mortalité ont diminué grâce à la mise en place du programme de dépistage du cancer du col de l'utérus (Test de Papanicolaou). Au Canada, les chances de survie au cancer du col sont estimées à 75% sur 5 ans (Société canadienne du cancer, 2011).

2.2 Pathogénèse

2.2.1 Progression des lésions

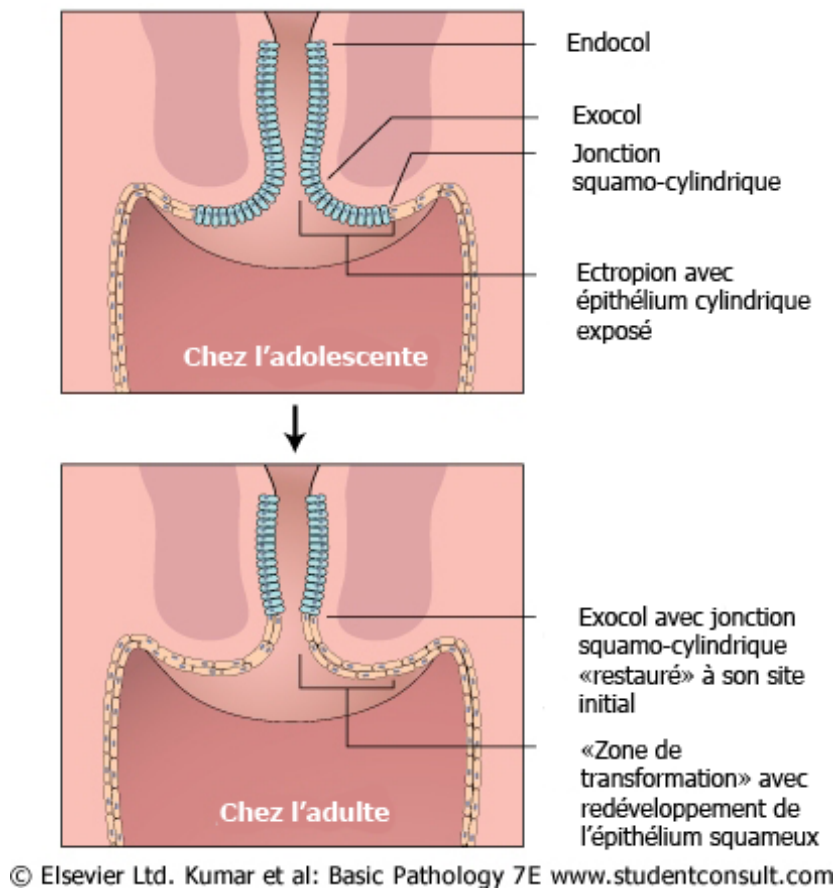


Figure 7 : Schéma de la zone de transformation.

Durant l'adolescence, la zone de transformation subit des changements la rendant plus vulnérable à l'infection par le papillomavirus humain et aux lésions qui en résultent.

Modifié de Kumar, V., Robbins, S.L., Cotran, R.S. (2005) Basic Pathology, 7ème édition.

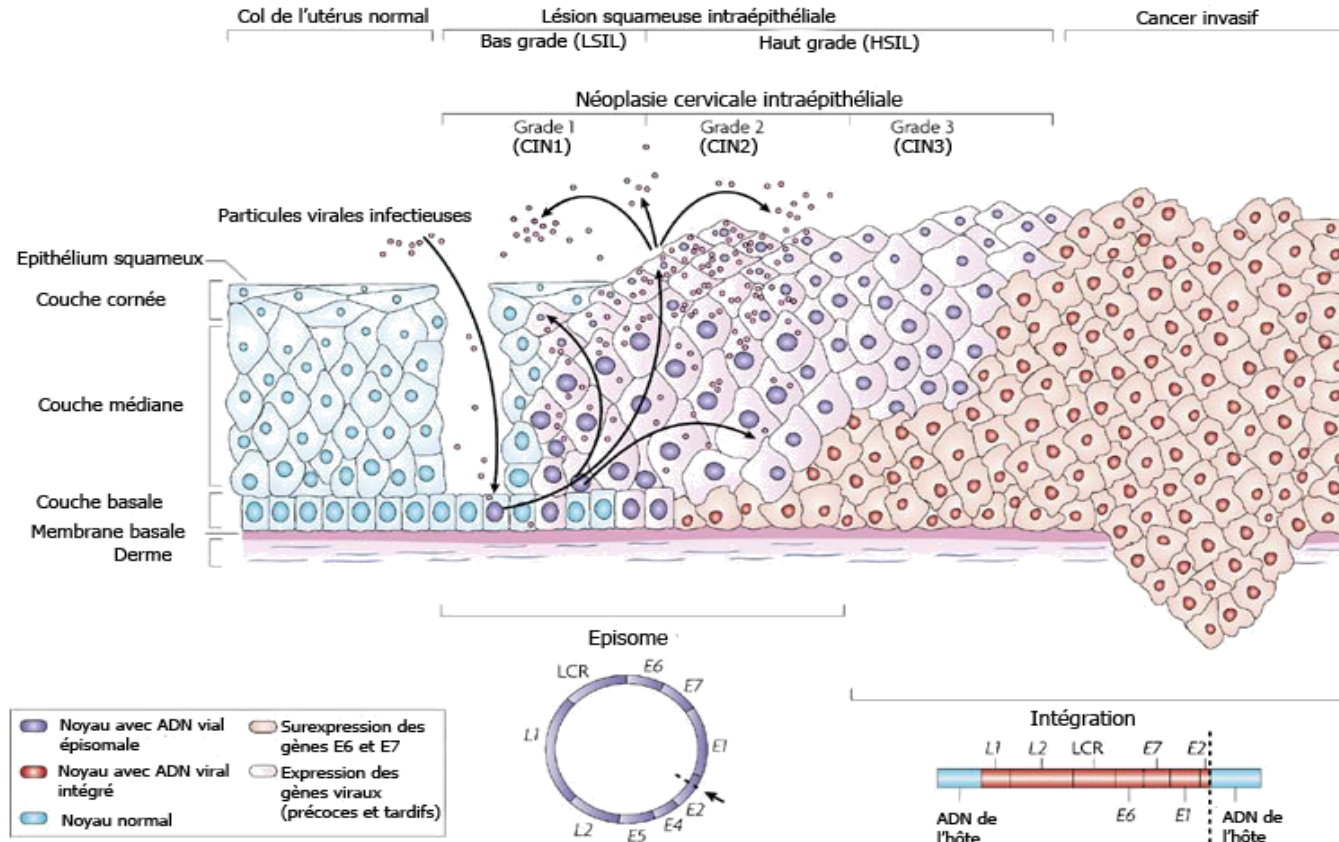
Au niveau du col de l'utérus, les VPHs vont infecter la zone de transformation, zone faisant la jonction entre l'épithélium malpighien de l'exocol, appelé aussi épithélium stratifié squameux, et l'épithélium glandulaire de l'endocol.

La zone de transformation est propice au développement de lésions précancéreuses car les cellules basales sont directement exposées à l'environnement (Société canadienne du cancer, 2012). Ces lésions sont classifiées selon les résultats d'un frottis cytologique ou d'un examen histologique sur une biopsie. Dans la classification histologique, les néoplasies cervicales intraépithéliales vont évoluer du grade 1 vers le grade 3 (CIN1, 2, 3) qui correspondent à des dysplasies légères, modérées et sévères (Benedet et al., 2006; Scully et al., 1994). Pour les tests cytologiques, la classification de Bethesda de 2001 est utilisée et permet de les classer en lésions squameuses intraépithéliales de bas-grade (LSIL) ou de haut-grade (HSIL) (Apgar et al., 2003; Solomon et al., 2002). La classification selon un résultat cytologique est moins précise qu'avec un test histologique, car une cytologie avec HSIL peut correspondre à une CIN de grade 2 ou de grade 3. De plus, la cytologie est moins sensible pour détecter les lésions. Le test histologique permet de mieux prévoir l'évolution de la maladie puisque qu'une CIN3 indique une plus grande probabilité d'évolution vers le cancer et représente le précurseur immédiat du cancer (Schiffman et al., 2011).

Les lésions de haut-grade, ou dysplasies sévères peuvent régresser spontanément. Une fois le stade du cancer atteint, les lésions ne peuvent plus régresser spontanément. Environ 30% des femmes qui ont des lésions précancéreuses de haut-grade ne vont pas voir leur lésions régresser au cours du temps et vont par la suite développer un cancer (McCredie et al., 2008). Lorsque le stade du cancer est atteint, on observe la rupture de la membrane basale, sur laquelle reposent les cellules de l'épithélium, et la prolifération anarchique des cellules à travers celle-ci. La propagation du cancer se fait à proximité (vessie, rectum, etc.) et à distance par métastases via le système lymphatique et/ou sanguin (Société canadienne du cancer, 2012).

Dans le cas du cancer du col utérin, on observe deux types de cancer : le carcinome épidermoïde, qui représente 90% des cas, et l'adénocarcinome, qui est moins fréquent (Liu et al., 2001). Cependant, l'adénocarcinome est moins facilement détecté par

les tests de dépistage. Son incidence dans les pays développés, contrairement au carcinome squameux, n'a donc pas diminué malgré la mise en place de programmes de dépistage (Bergstrom et al., 1999; Monsonego, 2007).



Nature Reviews | Cancer

Figure 8 : Représentation du développement des lésions au niveau du col utérin. On observe le développement de cellules atypiques, avec un noyau plus important. Il y a tout d'abord développement d'une lésion de bas-grade (CIN1) qui peut évoluer vers une lésion de haut-grade (CIN2,3) et enfin vers le cancer invasif avec rupture de la membrane basale et prolifération cellulaire au travers de celle-ci ainsi que la formation de métastases pouvant affecter d'autres organes.

Modifié de Woodman, C.B., Collins, S.I., Young, L.S. (2007) The natural history of cervical HPV infection : unresolved issues. *Nature Reviews Cancer* 7(1), 11-22.

2.2.2 Rôle des oncoprotéines E5, E6 et E7 dans la carcinogénèse du col de l'utérus

Les propriétés oncogènes des VPHs HR sont en grande partie dues à l'expression des protéines oncogènes virales E5, E6 et E7.

a) Potentiel oncogène de la protéine E5

Le rôle de E5 dans la carcinogénèse est moins connu que celui des protéines E6 et E7. Elle est exprimée durant les phases précoces de l'infection. Le gène E5 est fréquemment délété en cas d'intégration du génome viral (Venuti et al., 2011; zur Hausen, 2002). Tout d'abord, E5 interagit avec les récepteurs à l'EGF (facteur de croissance épidermique) et retarde leur endocytose, ce qui augmente leur concentration à la surface cellulaire. Elle limite aussi leur dégradation en diminuant l'acidification dans les endosomes. Tout cela a pour effet de stimuler la prolifération cellulaire (Kim et al., 2010; Mougin et al., 1997; Straight et al., 1993). On observe dans les cellules exprimant E5 une augmentation de l'expression des gènes c-Fos, c-Jun (Bouvard et al., 1994). Or le complexe AP-1 qui est composé des molécules Fos et Jun, est un facteur activateur de la transcription des gènes viraux ce qui pourrait induire une augmentation de la transcription des autres oncogènes viraux E6 et E7 (Mahata et al., 2011).

Une autre fonction de E5 est d'interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte face au VPH. Elle peut diminuer l'expression du CMH I, ce qui contribue à diminuer la reconnaissance du virus par le système immunitaire (Ashrafi et al., 2006; Campo et al., 2010). Elle semble aussi diminuer l'expression de TAP1, qui est essentiel au transport des peptides antigéniques (Mougin et al., 1997).

b) *Coopération entre les deux oncoprotéines E6 et E7 pour la transformation et l'immortalisation cellulaire*

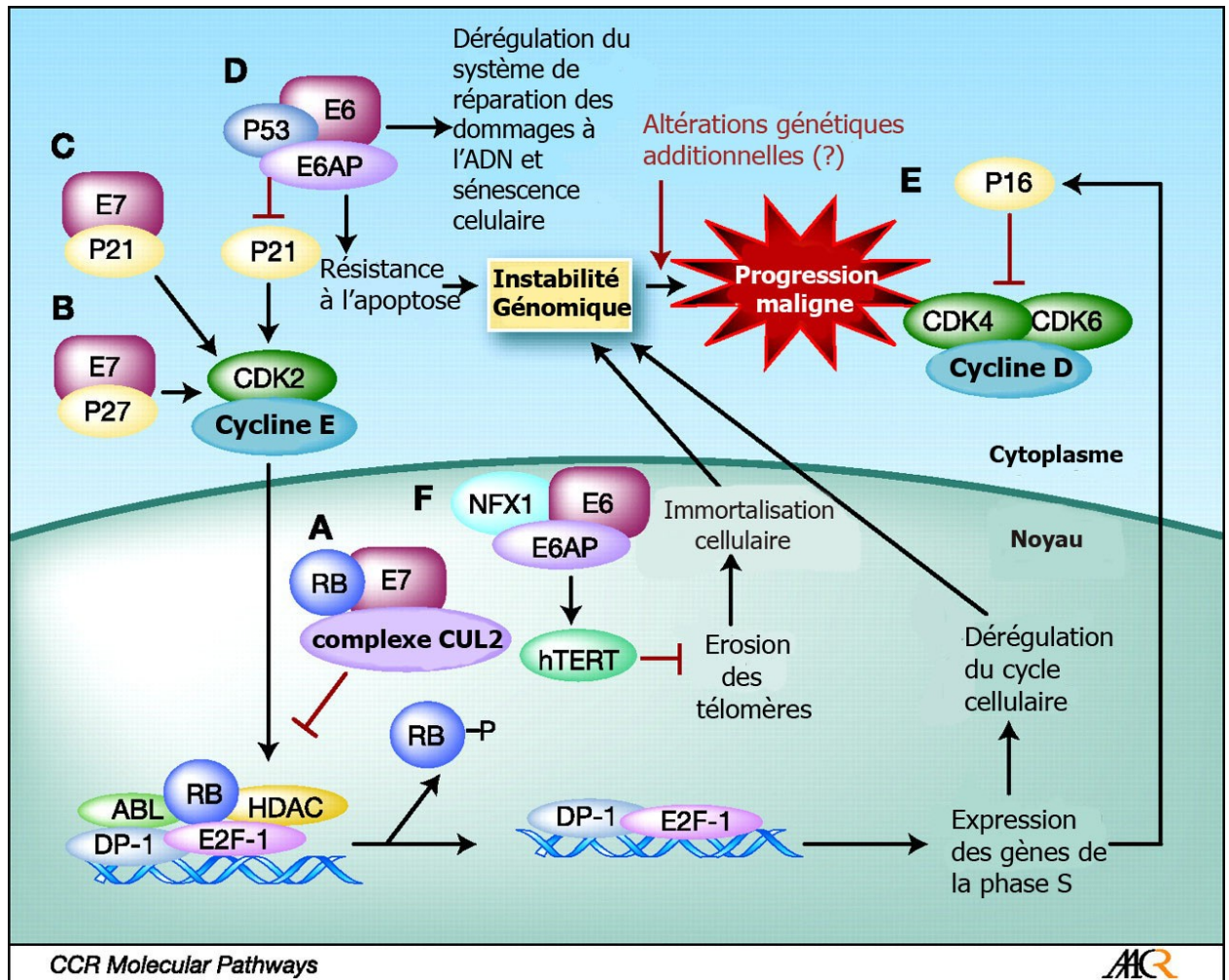


Figure 9 : Les oncoprotéines virales E6 et E7 interagissent avec des facteurs cellulaires, ce qui mène à la transformation et à l'immortalisation cellulaire.

Les protéines E6 et E7 se lient, respectivement, à p53 et pRb entraînant leur ubiquitination puis leur dégradation via le protéasome. La dégradation de ces deux protéines provoque une dérégulation du cycle cellulaire ainsi qu'une instabilité génomique. La protéine E6 empêche aussi le raccourcissement normal des télomères au cours des divisions cellulaires, en agissant sur l'expression de la transcriptase inverse de la télomérase hTERT, ce qui mène à l'immortalisation cellulaire.

Modifié de Chung, C.H., Gillison, M.L. (2009) Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. Clin Cancer Res. 15(22), 6758-62.

Même si à l'évidence E5 a des propriétés contribuant au potentiel oncogénique du papillomavirus, E6 et E7 restent les oncogènes majeurs du VPH et coopèrent pour transformer et immortaliser les cellules de l'hôte (Alain et al., 2010). Seules E6 et E7 des VPHs HR possèdent ces capacités. En effet, les VPHs LR ne démontrent que peu ou pas d'activité transformante (Storey et al., 1988).

Dans un premier temps, E7 va se lier au complexe cellulaire formé par pRb, ou une autre protéine membre de la famille de pRb (p107 et p130), et le facteur de transcription E2F (Hu et al., 1995). Lorsque E2F est complexé avec pRb, il est alors inactif et ne favorise pas la transcription des gènes nécessaires à l'entrée de la cellule en phase de réplication (phase S). Or, la liaison de E7 avec pRb entraîne le relâchement du facteur E2F, ce qui permet l'entrée de la cellule en phase S. De plus, E7 va recruter une ubiquitine ligase, la culline 2, pour ubiquitiner pRb et entraîner sa dégradation par le protéasome (Huh et al., 2007). En réponse à la prolifération cellulaire anarchique induite par E7, la cellule-hôte va enclencher le processus de mort cellulaire programmée, aussi nommé apoptose, par le biais du suppresseur de tumeur p53. La fonction de p53 dans la cellule est de protéger celle-ci de l'instabilité génomique. Elle est donc activée en cas de prolifération anarchique des cellules menant à l'accumulation d'erreurs génomiques puis à la formation de tumeurs (May and May E., 1998). Ainsi, en cas de dommages causés à l'ADN, l'activation de p53 peut entraîner la cellule dans deux voies : soit un arrêt du cycle cellulaire en G1 pour réparer les dommages causés à l'ADN avant la phase S, soit la voie de l'apoptose. Cependant, dans le cas où pRb n'est plus fonctionnel, la cellule privilégie l'apoptose (May and May E., 1998). Pour contrer l'apoptose dépendante de p53, le VPH va exprimer une deuxième protéine oncogène, E6. E6, qui est composée de 151 acides aminés, va former un complexe trimérique avec p53 et une ubiquitine ligase, E6AP (« E6 Associated Protein ») (Scheffner et al., 1993). E6AP va ubiquitiner p53, qui n'est pas un substrat naturel de E6AP mais qui devient sa cible en présence de la protéine E6 des VPHs HR. E6 des VPHs LR peut aussi lier le p53 mais n'est pas capable d'induire sa dégradation (Bodily and Laimins, 2011). L'ubiquitination de p53 entraîne sa dégradation par le protéasome, empêchant la cellule d'entrer en apoptose, favorisant l'immortalisation cellulaire (Zimmermann et al., 1999). L'immortalisation cellulaire, en complément d'autres facteurs, peut mener à la tumorigénèse, car l'infection par le VPH

est nécessaire mais pas suffisante pour provoquer le développement de lésions invasives du col utérin (Schiffman et al., 2011).

Une autre fonction de E6 est sa capacité à se lier au co-activateur du p53 CBP/p300, ayant pour fonction d'acétyler le domaine C-terminal de p53. Cette liaison a pour effet de diminuer l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 (Zimmermann et al., 1999). Or, l'expression de plusieurs protéines cellulaires est dépendante de p53, dont p21 qui est une protéine inhibitrice des kinases (Cdk) nécessaires pour les transitions du cycle cellulaire, ou Bax qui est une protéine pro-apoptotique. La répression de p21 empêche l'inhibition de Cdk2, la kinase nécessaire à l'activation de la cycline E, et provoque la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. E7 va elle aussi agir sur les complexes cycline/kinase, en bloquant les activités inhibitrices de p21 et p27 sur, respectivement, Cdk2 et les cycline A et E, provoquant une transition dans les phases de prolifération du cycle cellulaire (phases S et M) (Villa et al., 2002). p53 agit aussi sur les facteurs cellulaires impliqués dans l'apoptose, en activant Bax et en inhibant le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Hemann and Lowe, 2006). Cependant, dans le contexte viral des VPHs HR, p53 étant dégradée, elle ne peut plus jouer son rôle d'inhibitrice de Bcl-2. Bcl-2 est donc activé et empêche la cellule d'entrer dans la voie de la mort cellulaire programmée. E6 est également capable de se lier à Bak, prévenant son effet pro-apoptotique (Jackson et al., 2000).

En plus de ses conséquences sur p53 et les protéines p53-dépendantes, E6 possède l'habileté d'interagir avec de nombreux autres partenaires cellulaires (Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008). Elle est notamment capable d'interagir avec les protéines possédant un domaine PDZ et médie leur dégradation par le protéasome, ce qui a pour effet de perturber l'adhésion cellulaire et joue un rôle important dans la formation des métastases (Massimi et al., 2004). E6 peut aussi inhiber NFX1, un répresseur transcriptionnel de la hTERT (transcriptase inverse de la télomérase), qui code pour la sous-unité catalytique de la télomérase. Cette interaction entraîne une augmentation de l'expression de la télomérase (Veldman et al., 2001). Ainsi, les télomères des cellules infectées par les VPHs HR ne raccourcissent plus au fil des divisions cellulaires,

contrairement à ce qui se passe en temps normal dans des cellules non-infectées. L'immortalisation cellulaire s'ensuit.

E6 et E7 ont la capacité de s'associer avec un oncogène cellulaire, *c-myc*, et d'augmenter son activité transcriptionnelle. Cette interaction pourrait accroître le risque d'immortalisation de la cellule-hôte (Wang et al., 2007).

2.3 Facteurs de risques pour le développement de lésions précancéreuses et de cancer du col de l'utérus

L'infection par le VPH est indispensable pour le développement du cancer de l'utérus, mais elle n'est pas suffisante. D'autres facteurs, qu'ils soient viraux, environnementaux ou qu'ils concernent l'hôte, sont nécessaires à l'évolution de la maladie (Schiffman et al., 2011; Trottier and Franco, 2006).

2.3.1 Facteurs viraux

a) Persistance de l'infection

La persistance de l'infection au VPH est un marqueur pertinent pour la progression de la maladie. En effet, dans la plupart des cas, la persistance précède l'apparition de lésions précancéreuses (Bodily and Laimins, 2011; Wallin et al., 1999). Les femmes ayant une infection persistante avec un VPH HR pendant plus de 12 mois, qui est le temps moyen d'élimination d'une infection au VPH, ont un risque accru de développer des lésions précancéreuses de haut-grade ou un cancer (Monsonogo, 2007; Schlecht et al., 2001). Des études réalisées sur plusieurs types de VPH, dont les VPH16, 18, 33, 52, ont permis de démontrer que le polymorphisme viral est associé à la persistance de l'infection (Aho et al., 2004; Gagnon et al., 2004; Xi et al., 2006). Durant une période importante de l'infection, la réplication de l'ADN viral est minime, ce qui permet au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Bodily and Laimins, 2011).

Cependant, le VPH continue à exprimer ses oncogènes, ce qui peut mener à l'apparition de lésions au niveau du col de l'utérus (Monsonogo, 2007).

b) Intégration du génome viral

L'intégration du génome viral dans les chromosomes de la cellule-hôte est caractéristique des VPHs HR, et constitue un élément-clé de la progression vers le cancer (zur Hausen, 2002). Lors de la linéarisation du génome viral qui précède l'intégration, il y a le plus souvent perte des cadres de lecture (ORF) E1 et E2. En temps normal, E2 exerce une activité répressive sur la transcription des gènes précoces. Ainsi, la perte de E2 permet la surexpression des oncogènes E6 et E7, entraînant notamment une augmentation de l'activité télomérase, ce qui contribue à la transformation et à l'immortalisation de la cellule hôte (Greslin et al., 1998). De plus, lors de l'intégration du génome viral, celui-ci peut s'établir à proximité d'un proto-oncogène cellulaire tel que *c-myc* et entraîner sa surexpression, ce qui mène à la prolifération cellulaire et favorise la carcinogénèse (Ferber et al., 2003).

c) Charge virale

Plusieurs études ont démontré que la charge virale du VPH joue un rôle dans la persistance et la progression de la maladie (Kim et al., 2012). Une charge virale modérée à élevée lors d'une infection avec un VPH HR augmente le risque de développer des lésions précancéreuses et même un cancer invasif (Flores et al., 2006; Hwang et al., 2010). Pour le VPH16, qui est le génotype le plus étudié, une association entre une charge virale élevée et le développement de lésions précancéreuses a été démontrée (Gravitt et al., 2007; Josefsson et al., 2000; Tabora et al., 2008). Une étude a également établi qu'une charge virale épisomale élevée du VPH33 augmente le risque de lésions de haut-grade du col utérin (Khouadri et al., 2007). On peut également noter qu'une association entre le niveau de la charge virale et le développement d'une infection persistante a été retrouvée pour les VPH16 et 18 mais n'a pas pu être retrouvée chez les femmes infectées par les VPH31, 33 ou 45 (Carcopino et al., 2011; Ramanakumar et al., 2010), ceci pouvant être dû au fait que les génotypes ont des comportements biologiques différents, au niveau de

la réplication virale par exemple. Une étude a démontré que les lésions de grade CIN2,3 provoquées par le VPH16 se développent plus rapidement que celles provoquées par les autres génotypes HR. Ce phénomène pourrait expliquer que le niveau de charge virale du VPH16 peut avoir une plus grande influence sur le développement des lésions (Wentzensen et al., 2013).

d) Rôle du polymorphisme génétique

La présence de mutations au niveau des séquences codantes et non-codantes du génome viral peut influencer sur le potentiel oncogénique du virus (Giannoudis and Herrington, 2001). Ainsi, certaines variantes vont augmenter le risque de développer des lésions précancéreuses ou un cancer du col utérin par rapport à d'autres variantes du même type. Des mutations au niveau des oncogènes E6 et E7 peuvent modifier les caractéristiques de ces deux protéines. Un polymorphisme au niveau des gènes de la capsid virale pourrait théoriquement modifier leurs propriétés antigéniques virales et donc d'aider à l'évasion au système immunitaire de l'hôte. Des mutations au niveau du LCR influencent la liaison des facteurs de transcription à celui-ci et pourraient moduler la transcription des gènes précoces viraux ainsi que la réplication virale. Le polymorphisme du génome viral sera revu plus en détail dans le chapitre trois qui lui est consacré.

2.3.2 Facteurs de l'hôte

a) Ethnicité

L'origine ethnique peut jouer un rôle important dans la carcinogénèse. L'ethnicité est souvent liée à la distribution des types de VPH dans une population, ainsi qu'au polymorphisme viral. Les variantes non-européennes du VPH16 confèrent un risque accru de cancer par rapport aux variantes dites européennes (Villa et al., 2000). Il est cependant difficile de dissocier le rôle de l'ethnicité des facteurs confondants (manque de dépistage, malnutrition, parité élevée) retrouvés dans les pays en voie de développement.

b) Âge

De nombreuses recherches ont montré l'effet de l'âge sur la présence de cancer du col de l'utérus (Munoz et al., 2006). Ainsi, les femmes de plus de 45-50 ans sont plus à risque de développer un cancer. Ceci s'explique par le fait que le développement de lésions se fait sur une longue période suivant l'infection par un VPH HR. En effet, le stade du cancer est atteint en moyenne 10 à 20 ans après le début de l'infection (Alain et al., 2010). Après 10 ans d'infection, le risque de développer des lésions de haut-grade ou un cancer est de 17.2% avec le VPH16 contre 13.6% avec le VPH18 mais est beaucoup plus faible avec les autres génotypes HR et presque nul avec les génotypes LR (Khan et al., 2005).

c) Prédispositions génétiques

D'un point de vue génétique, certaines personnes seront prédisposées au cancer du col de l'utérus. Des différences génétiques se retrouvent notamment au niveau des allèles HLA de classe II, qui sont impliqués dans la présentation antigénique. Les HLA de classe II peuvent être protecteurs ou favoriser le cancer (Trottier and Franco, 2006). Plusieurs études ont démontré que les personnes possédant les allèles HLA de type DQB1*0301-03 ont un risque accru de développer un cancer, mais d'autres recherches n'ont pas pu répéter ces résultats (Hildesheim and Wang, 2002). Cette discordance s'explique par des différences au niveau des populations étudiées et dans la distribution des allèles au sein de ces populations. L'équipe de Maciag et al., a observé que la combinaison d'allèles HLA-DRB1*1102-DQB1*0301 permettait de diminuer le risque de développer une infection persistante (Maciag et al., 2002). Un allèle HLA pourrait n'influencer que le risque d'infection persistante au VPH ou celui de lésions précancéreuses du col utérin en reconnaissant soit certains antigènes viraux, soit des antigènes de cellules transformées. Récemment, Chuang et al. ont démontré que la combinaison d'allèles HLA-DRB1*0405-DQA1*0301-DQB1*0302 est associée avec la persistance de l'infection au VPH18 et que l'allèle HLA-DRB1*0403 est associé avec un risque accru de développer une lésion CIN2,3 ou un cancer (Chuang et al., 2012). L'effet protecteur des allèles HLA

DRB1*1301-05 et DQB1*0603 vis-à-vis de l'infection persistante et du cancer (OR : 0.3-0.4) a été clairement établie dans plusieurs études (Hildesheim and Wang, 2002; Sastre-Garau et al., 1996). Ces allèles seraient capables d'une meilleure présentation antigénique des épitopes viraux aux cellules T naïves, et donc d'une meilleure réponse immunitaire de l'hôte, améliorant l'élimination de l'infection et la régression des lésions existantes. Certaines évidences suggèrent qu'il peut exister une association entre les allèles HLA et les variantes du VPH. Ainsi, la variante R10G du gène E6 serait associée avec l'allèle HLA-B7 dans les cas de cancer (Ellis et al., 1995).

2.3.3 Facteurs environnementaux

a) Tabagisme

Le tabac est un carcinogène reconnu qui cause la transformation des cellules de l'hôte. Dans le contexte du col de l'utérus, celui-ci pourrait agir comme un cocarcinogène qui augmenterait le risque de développer le cancer (Plummer et al., 2003). Ainsi, le tabac cause des dommages additionnels à l'ADN des cellules infectées par le VPH, et pourrait causer la surexpression de E6 et E7 (Castellsague and Munoz, 2003; Trottier and Franco, 2006). De plus, le tabac agit comme un immunosuppresseur, ce qui diminue la réponse immunitaire de l'hôte face au VPH (Alain et al., 2010).

Des études ont montré la présence de nicotine et d'autres métabolites issus des composants du tabac (benzo[a]pyrène par exemple) dans les sécrétions cervicales des fumeuses (Melikian et al., 1999; Prokopczyk et al., 1997). L'exposition à long-terme des cellules épithéliales du col utérin à la nicotine peut influencer sur l'inhibition de l'apoptose cellulaire et donc sur la prolifération cellulaire (Fonseca-Moutinho, 2011). Le tabagisme accroît le risque de développer des lésions précancéreuses de haut-grade ou un cancer, et cela en fonction du nombre de cigarettes fumées et de la durée de la prise du tabac (Castellsague and Munoz, 2003). Le risque de lésions du col utérin augmente de 2.3 fois pour les fumeuses actuelles et de 1.8 fois pour les anciennes fumeuses. Ainsi, le risque semble diminuer avec l'arrêt du tabac (Plummer et al., 2003; zur Hausen, 2006).

b) Nombre de grossesses

Les femmes ayant eu des grossesses multiples seraient plus à risque de développer un cancer du col de l'utérus (Munoz et al., 2002). La présence de lésions de haut-grade ou de cancer augmente avec le nombre de grossesses. Une étude réalisée au Costa-Rica a montré que les femmes ayant donné naissance à 4 ou 5 enfants augmentent leur risque de développer des lésions de 3.7 fois (95% CI : 1.8-7.4) (Hildesheim et al., 2001a), tandis qu'une autre étude démontre qu'une histoire de sept grossesses ou plus accroît le risque de 3.8 fois (95% CI 2.7-5.5) (Munoz et al., 2002). Des changements hormonaux survenant pendant la grossesse seraient un des facteurs responsables de cette augmentation du risque (Castellsague and Munoz, 2003). Ces changements peuvent être responsables d'une immunosuppression ou éventuellement de la surexpression des oncoprotéines E6 et E7 chez les femmes déjà infectées (Sethi et al., 1998). De plus, l'apparition de traumatisme lors de l'accouchement pourrait favoriser une infection ultérieure au VPH.

c) Prise de contraceptifs oraux

Les contraceptifs oraux contiennent un progestatif et un dérivé de l'œstradiol. Or les œstrogènes (œstradiol) et la progestérone ont un rôle activateur sur l'activité transcriptionnelle, provoquant une augmentation de la transcription des oncogènes viraux (Michelin et al., 1997; Mougin et al., 1997). Une étude a établi que la transcription et la réplication des VPH16, 18 et 31 sont induites par la progestérone (Villa et al., 2002). Une étude regroupant les données de vingt-quatre études épidémiologiques a démontré que le risque de développer des lésions augmente de 1.9 fois (95% CI: 1.69-2.13) après plus de 5 ans d'utilisation de contraceptifs oraux, comparativement aux femmes qui n'en ont jamais pris (Appleby et al., 2007). Toutefois, l'association entre la prise de contraceptifs et un risque accru de développer un CIN2,3 reste controversée, plusieurs études ayant échoué à démontrer cette association (Deacon et al., 2000; Longatto-Filho et al., 2011). Il faut réaliser qu'il est difficile de dissocier l'effet des contraceptifs oraux de celui dû au comportement sexuel, qui augmente le risque d'infection au VPH.

d) Présence d'autres infections sexuellement transmissibles (IST)

D'autres infections sexuellement transmissibles, telle que le VIH ou le *Chlamydia trachomatis*, peuvent agir comme des cofacteurs pour le développement de lésions du col de l'utérus. Le VIH cause une immunodéficience chez l'hôte, le rendant vulnérable à la progression de la maladie. En effet, le système immunitaire étant affaibli, il ne peut plus lutter efficacement pour éliminer l'infection au VPH ou les cellules transformées (Chopra and Tyring, 1997). L'infection par *C. trachomatis* a été reconnue comme un cofacteur du VPH dans plusieurs études. Elle peut causer une inflammation chronique au niveau du tractus génital féminin, ce qui facilite la persistance de l'infection au VPH, et constitue en soi un facteur de risque (zur Hausen, 2006). Malgré des suspicions que le virus de l'herpès simplex 2 (HSV-2) était un cofacteur du VPH pour le développement de lésions du col de l'utérus, la plupart des études réalisées n'ont pu conclure à une telle association (Lehtinen et al., 2002; Tran-Thanh et al., 2003).

e) Régime alimentaire

Une diète riche en vitamines C et E, en carotène, ainsi que la consommation régulière et en grande quantité de fruits et légumes aurait un effet protecteur contre le développement d'une infection persistante au VPH et les lésions qui en résultent (Garcia-Closas et al., 2005; Giuliano et al., 2003).

2.4 Dépistage et Vaccination

2.4.1 Test de dépistage

Il existe un test permettant de détecter des anomalies cytologiques au niveau des cellules du col utérin. Ce test est appelé test Pap (Papanicolaou). Il consiste en un prélèvement des cellules du col utérin, puis en la fixation et l'analyse microscopique de celles-ci. Les cellules anormales se distinguent par la présence d'un plus gros noyau. Depuis sa mise en place, le test Pap a permis une réduction de 80% du nombre de cas de cancer du col de l'utérus aux États-Unis (Bodily and Laimins, 2011). Le test Pap doit être pratiqué régulièrement chez les jeunes femmes ayant eu des relations sexuelles, à partir de 21 ans et jusqu'à environ 65 ans. Le risque de développer un cancer du col utérin est faible (1,4 sur 100 000 femmes) si le dépistage est réalisé régulièrement entre 21 et 65 ans (Monsonogo, 2007). En 2002, plus de 50% des femmes ayant développé un cancer n'avaient pas eu de test de dépistage dans les 5 ans auparavant (Nindl, 2002). Malgré la mise en place du programme vaccination, le test de dépistage reste essentiel pour détecter le cancer du col de l'utérus car tous les types de VPH causant le cancer ne sont pas inclus dans les vaccins (Markowitz et al., 2007). Toutefois, même si le test Pap a prouvé son efficacité dans les pays développés, 80% des nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués dans les pays en développement ne possédant pas de programme de dépistage adéquat (Castellsague, 2008; Lehoux et al., 2009).

2.4.2 Principe de la vaccination

La protéine L1, avec ou sans L2, est capable de s'auto-assembler en virus VLPs, des capsides virales vides et non-infectieuses, ayant la capacité de se lier aux récepteurs du VPH à la surface cellulaire (Kirnbauer et al., 1992). L'injection de ces VLPs permet de déclencher une réaction immunitaire, entraînant la sécrétion d'anticorps neutralisants pour au moins 8 ans (Franco, 2009). En 2006-2008, les vaccins prophylactiques Gardasil© et Cervarix© sont mis sur le marché. Ces vaccins protègent contre les VPH16, 18, 6 et 11

et les VPH16 et 18, respectivement. Toutefois, ces vaccins protègent contre une infection initiale avec ces types de VPH et contre les lésions qu'ils pourraient provoquer, mais ne protègent pas si l'infection est déjà établie avant la vaccination (Huang et al., 2010). Des vaccins thérapeutiques ayant pour cible E6 et E7 qui sont exprimés de façon constitutive dans les cas de cancers, ont montré une certaine efficacité pour diminuer la croissance des tumeurs dues au VPH (Barrios and Celis, 2012; Li et al., 2010).

2.4.3 Recommandation vaccination au Canada

En Amérique du Nord, la vaccination avec le Gardasil© ou le Cervarix© cible les préadolescentes de 9 à 13 ans (Markowitz et al., 2007). Il est important que la vaccination soit faite avant le début de l'activité sexuelle. Néanmoins, la vaccination est recommandée par le Comité consultatif national de l'immunisation (CCNI) pour les jeunes femmes jusqu'à 26 ans et est approuvée pour les femmes jusqu'à 45 ans, car elles peuvent ne pas avoir été encore en contact avec les types de VPH inclus dans le vaccin (Comité Consultatif National de l'Immunisation (CCNI), 2012). Le Gardasil© est aussi recommandé pour les jeunes hommes de 9 à 26 ans, notamment pour ceux ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes, afin de les protéger des lésions anales causées par le VPH (Comité Consultatif National de l'Immunisation (CCNI), 2012). Les deux vaccins sont généralement bien tolérés et sécuritaires (Monsonogo, 2007).

2.4.4 Résultats de la vaccination

La phase II de l'essai clinique du vaccin quadrivalent Gardasil© a montré que le taux d'anticorps protecteurs reste élevé sur une longue période (plus de 3 ans), et a mis en évidence une baisse d'environ 90% de l'incidence de l'infection des quatre types de VPH contenus dans le vaccin (Villa et al., 2005). Une étude sur le vaccin bivalent Cervarix© a établi qu'il est efficace pour prévenir les infections persistantes liées aux types 16 et 18 pendant plus de 27 mois (Harper et al., 2004). Des études récentes ont mis en évidence l'efficacité du vaccin pour la prévention des infections au VPH et des pathologies qui leur

sont associées, ainsi que la longue durée de protection, de plus de 5 ans d'après les données existantes, et ce même si les trois doses du vaccin n'ont pas été injectées (National Cancer Institute (NCI), 2011a). De plus, on a noté une réactivité croisée qui permet d'avoir une protection partielle contre les VPH31, 33, 45 et 51, liés phylogénétiquement aux VPH16 et 18 (National Cancer Institute (NCI), 2011b; Schiffman et al., 2011). D'autres vaccins seraient en cours d'étude et incluraient plus de génotypes que les vaccins de première génération, dont le VPH52.

L'un des problèmes majeurs du vaccin est qu'il n'est pas facilement délivrable dans les pays en développement car il est trop coûteux de part le coût d'achat du vaccin le fait qu'il nécessite du matériel de réfrigération et du personnel qualifié. Des études ont montré que des vaccins administrés par voie nasale ou orale provoquent la sécrétion d'anticorps protecteurs, ce qui rendrait la vaccination contre le VPH moins coûteuse (Balmelli et al., 1998; Sasagawa et al., 2005).

3. Variantes du VPH

Le polymorphisme du génome viral peut influencer sur le potentiel oncogène du VPH. On définit une variante intra-typique lorsqu'il y a moins de 5% de variation dans les régions non-codantes ou moins de 2% de variation dans les régions codantes entre deux isolats d'un même type (Bernard et al., 2006). Le prototype représente la première variante décrite du type. Les variantes ont des propriétés biochimiques et biologiques différentes, ce qui modifie leur pathogénèse (Giannoudis and Herrington, 2001). L'étude de ces variantes permet d'approfondir nos connaissances sur la carcinogénèse induite par les VPHs, de mieux prévoir la progression de la maladie, ou d'élaborer un meilleur vaccin selon la région géographique.

3.1 Phylogénie des variantes intra-typiques

L'étude des variantes a permis de mettre en évidence la coévolution des VPHs avec l'homme ainsi que les migrations réalisées par les hommes, car leur distribution est différente selon les zones géographiques (Ho et al., 1993). Ainsi, une étude réalisée sur le VPH18 à partir d'échantillons provenant de quatre continents a permis de montrer l'association entre la diversité du VPH18 et la répartition ethnique sur les continents. Les variantes africaines présentaient la plus grande variabilité, ce qui suggère que l'Afrique serait le point d'origine de ce type (Ong et al., 1993). De même, l'analyse de la distribution des variantes du VPH58 a permis de retracer ses origines à l'Afrique de l'Ouest (Li et al., 2009).

Il est possible de classer les variantes du VPH16 en 5 branches phylogénétiques distinctes : E : Européenne, AA : Américano-Asiatique, As : Asiatique, Af1 et Af2 : Africaine 1 et 2. Il existe aussi la sous-branche Nord-Américaine (NA) (Villa et al., 2000). Une étude réalisée en Inde a permis de mettre en évidence la prédominance des variantes européennes dans les populations hindoues, ce qui indique un lien migratoire entre l'Europe et l'Inde (Pande et al., 2008).

Les variantes peuvent avoir un potentiel oncogénique différent selon la branche phylogénétique à laquelle elles appartiennent. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que les variantes non-européennes du VPH16 sont associées avec la persistance de l'infection et le développement de lésions de haut-grade (Villa et al., 2000). En particulier, les variantes AA du VPH16, 18 et 45 sont associées avec la forme plus rare du cancer du col utérin, l'adénocarcinome (Quint et al., 2010). Les variantes AA du VPH16 et du VPH18 ont pour propriété d'augmenter l'activité des promoteurs précoces p97 et p105, respectivement. Cette activité accrue augmente la transcription des oncogènes E6 et E7, rendant ces variantes plus carcinogènes que les variantes européennes (Kammer et al., 2000; Sichero et al., 2005). Dans une étude récente, Chang et al. ont établi que des variantes de la lignée C du VPH52 sont associées avec la présence de lésions de haut-grade (Chang et al., 2011).

3.2 Variantes de la région régulatrice virale (LCR)

Le LCR est la région la plus variable du génome viral, ce qui en fait une candidate idéale pour l'étude des variations génomiques (Giannoudis and Herrington, 2001). La présence de mutations dans la séquence nucléotidique du LCR pourrait affecter la liaison des facteurs de transcription activateurs ou répresseurs. La suppression ou l'ajout d'un site de liaison ainsi que la modification de l'affinité de liaison d'un facteur de transcription viral, tel que E2, ou cellulaire au LCR peut influencer la transcription virale, notamment celle des gènes précoces.

Plusieurs études ont décrit le polymorphisme du LCR de certains types de VPH dont le VPH16. Kämmer et al. ont examiné l'activité du promoteur précoce p97, situé dans le LCR, de différentes variantes du VPH16. Ils ont découvert que les variantes non-européennes du LCR (AA et NA) augmentent l'activité du promoteur précoce de 2 à 3 fois, ce qui pourrait accroître le potentiel oncogène de ces variantes par rapport au prototype qui appartient à la branche européenne (Kammer et al., 2000). Xi et al. ont aussi analysé les variations du LCR du VPH16. Les résultats obtenus montrent que les variantes non-prototypiques confèrent un plus grand risque de développer des lésions

CIN2,3 (Xi et al., 1997). Dans une autre étude, la plupart des variations retrouvées dans le LCR étaient situées dans des sites putatifs de liaison pour le facteur YY1. La perte d'un site YY1 augmenterait l'activité transcriptionnelle virale (Pande et al., 2008).

Au niveau du LCR du VPH33, une délétion de 78 pb est associée à la présence d'une infection persistante tandis qu'une substitution au niveau du nucléotide 7732 augmente le risque de développer des lésions de haut-grade ou un cancer du col utérin. Cette dernière variation causerait la perte d'un site de liaison pour le facteur USF (Gagnon et al., 2004; Khouadri et al., 2006). USF est impliqué dans l'expression à partir d'un promoteur tardif des adénovirus, mais son rôle n'a jamais été étudié chez les VPHs (Gregor et al., 1990).

Des mutations au niveau du LCR du VPH31 et 58 influent sur la liaison de facteurs de transcription comme SRY ou YY1, ou même sur la perte d'un site de liaison pour E2 exerçant une répression sur la transcription des oncogènes viraux. Ces variations pourraient augmenter l'oncogénicité du virus (Cento et al., 2011).

Une étude réalisée sur le VPH52 a démontré que des variantes non-prototypiques du LCR sont associées avec la persistance de l'infection, un marqueur prédictif de l'apparition de lésions précancéreuses (Aho et al., 2004). Les mécanismes moléculaires à la base de cette association n'ont pas encore été démontrés.

3.3 Variantes des oncogènes viraux E6 et E7

De nombreuses recherches ont été réalisées afin de décrire le polymorphisme des oncogènes viraux majeurs E6 et E7, et afin de déterminer l'impact de ces mutations sur la carcinogénèse induite par le VPH.

Une mutation non-synonyme au niveau des gènes E6 et E7 va entraîner un changement d'acide aminé au niveau des protéines codées par ces oncogènes. Ce changement d'acide aminé peut avoir plusieurs effets, du changement de conformation à

celui de fonction. Une mutation dans E6 peut influencer sur sa capacité à lier et à dégrader p53, tandis qu'une variation au niveau de E7 agirait sur la liaison de celle-ci à pRb.

Les études sur les variantes de E6 du VPH16, ont prouvé que celles-ci ont des propriétés biologiques et biochimiques différentes de celles du prototype (Stoppler et al., 1996). Ainsi, les variantes de E6 diffèrent dans leur affinité de liaison avec les molécules du système HLA, provoquant des différences dans la réponse immunitaire de l'hôte (Ellis et al., 1995; Zehbe et al., 2003). Les recherches portant sur l'effet direct du polymorphisme du gène E6 sur la carcinogénèse ont mené à différentes conclusions. Il a été démontré qu'il existe une association entre le polymorphisme du gène E6 et la persistance de l'infection au VPH ainsi qu'avec la présence de lésions de haut-grade du col utérin (Gheit et al., 2011; Grodzki et al., 2006; Xin et al., 2001). Cependant, l'association entre le polymorphisme du gène E6 du VPH16, du VPH33, ou du VPH52 et la présence d'une infection persistante ou de lésions du col utérin reste controversée, plusieurs études ayant échoué à démontrer cette association (Aho et al., 2004; Giannoudis and Herrington, 2001; Hu et al., 2001; Khouadri et al., 2006). Les différences dans la réalisation des études peuvent en partie expliquer ces résultats divergents : l'étude de génotypes différents, le nombre de participantes et leurs pathologies associées, l'âge des participantes, et l'ethnie peuvent influencer l'association d'une variante du gène E6 avec le développement de lésions de haut-grade. L'ethnicité en particulier est fortement liée aux variantes du VPH retrouvées. Il a été clairement démontré que les variantes non-européennes du VPH16 et du VPH18 sont associées avec le développement de lésions du col utérin. Ceci peut-être dû à l'association entre certaines variantes du VPH et les HLA de l'hôte (Giannoudis and Herrington, 2001; Sichero et al., 2007). L'étude de Hildesheim et al. a démontré que les variantes non-européennes du VPH16 étaient associées avec la présence de la combinaison d'allèles HLA DRB1*1102-DQB1*0301 ($p=0.0005$) (Hildesheim et al., 2001b). Une mutation du nucléotide 350 du gène E6 (L83V) est retrouvée très fréquemment au niveau de plusieurs types de VPH (VPH16, 33 et 52) et dans des populations d'ethnies diverses (Aho et al., 2004; Cento et al., 2009; Ding et al., 2010; Grodzki et al., 2006).

En ce qui concerne le gène E7, l'effet de son polymorphisme sur la carcinogénèse du col utérin a été moins étudié. On peut tout de même noter que la variante N29S du VPH16 est retrouvée dans 70% des cas de cancer invasif (Giannoudis and Herrington, 2001), tandis que les variantes du gène E7 du VPH33 et 35 ayant des mutations non-synonymes sont associées avec la présence d'une infection persistante (Gagnon et al., 2004). Une étude de Chan et al. a démontré que deux mutations retrouvées au niveau du gène E7 du VPH58 sont associées avec un plus grand risque de développer des lésions du col utérin (Chan et al., 2002).

3.4 Variantes des autres gènes viraux (L1, E2)

Des mutations sont aussi retrouvées dans toutes les autres régions codantes du génome viral. Un changement dans la séquence protéique de L1 ou de L2 peut avoir un effet important sur la conformation ou le potentiel antigénique de ces protéines, c'est-à-dire sur la présentation des épitopes viraux au système immunitaire de l'hôte. Ces variations peuvent jouer un rôle potentiel dans l'évasion du virus face au système immunitaire et à l'établissement d'une infection persistante. Le polymorphisme de L1 a été décrit pour plusieurs types, étant donné que celle-ci est importante pour la vaccination (Cento et al., 2011; Frati et al., 2011). Ainsi, il a été découvert qu'une variante de L1 du VPH16 a la capacité de s'auto-assembler en VLP, tandis qu'une autre variante en est incapable à cause d'un changement d'acide aminé (Kirnbauer et al., 1993). Les variations non-synonymes se retrouvent le plus souvent dans les sections exposées des boucles de L1. Les sections non-exposées de L1 seraient donc très conservées, ce qui implique qu'il existe des contraintes de sélection sur L1 (Cornut et al., 2010). Dans une étude récente, le polymorphisme du gène L1 fut associé avec la présence de lésions de bas-grade (Cento et al., 2012). Par contre, aucune association entre les variations du gène L1 du VPH52 et la persistance de l'infection n'a été mise en évidence (Gagnon et al., 2007).

Des variations dans E2 peuvent entraîner une modification de l'activité répressive exercée par E2 sur la transcription des oncogènes E6 et E7, ce qui peut entraîner leur surexpression et augmenter leur activité transformante sur la cellule hôte. Une variante

entraînant une perte partielle ou totale de la fonction répressive de E2 peut donc avoir un impact sur la carcinogénèse. Cependant, la plupart des études réalisées sur le polymorphisme du gène E2 n'ont pas démontré des différences significatives dans l'activité répressive des différentes variantes. De plus, la majorité des études n'ont pas établi d'association entre les mutations présentes au niveau de E2 et un plus grand risque de lésions du col utérin (Graham and Herrington, 2000; Khouadri et al., 2006). Toutefois, une équipe a montré qu'une variation dans le domaine de liaison du gène E2 du VPH16 était significativement associée aux lésions de haut-grade (HSIL) (Giannoudis et al., 2001).

PROJET DE RECHERCHE

Déclaration de l'étudiante

J'ai participé à la réalisation de ce projet par la conception de certaines amorces ainsi qu'à l'optimisation des conditions de PCR. J'ai effectué les manipulations de lyse cellulaire, d'amplification par PCR ainsi que la technique de séquençage. Par la suite j'ai étudié les séquences obtenues pour caractériser les variantes du LCR et du gène E6. Enfin, j'ai participé aux analyses statistiques, à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article.

Hypothèses et Objectifs

Notre étude porte sur le polymorphisme du VPH52 de la région régulatrice virale et de l'oncogène E6. Les échantillons analysés proviennent de plusieurs études épidémiologiques réalisées chez des femmes canadiennes d'âge et d'ethnies diverses, ayant différents grades de lésions précancéreuses ou un cancer au niveau du col utérin. Ce projet s'inscrit dans la continuité d'une étude précédente réalisée dans notre laboratoire qui a permis d'établir l'association entre le polymorphisme du LCR du VPH52 et la persistance de l'infection, un marqueur prédictif du développement de lésions de haut-grade, dans une population de femmes infectées ou à risque d'infection par le VIH (Aho et al., 2004). Par ailleurs, des études effectuées sur le VPH de type 16, relié phylogénétiquement au type 52, ont démontré l'association entre le polymorphisme viral et la persistance de l'infection au VPH (Londesborough et al., 1996; Xi et al., 2006) ainsi qu'avec la présence de lésions au niveau du col utérin (Villa et al., 2000).

Cette étude a deux objectifs fondamentaux. Le premier est de décrire le polymorphisme de deux régions du génome viral, soit le LCR et le gène E6, par la technique de PCR-séquençage. Le second est de définir l'association entre les variantes découvertes et la présence de lésions de haut-grade (CIN2,3) ou de cancer du col de l'utérus. Au cours de nos recherches, nous nous attendons à retrouver des variantes déjà décrites dans l'étude sur les femmes infectées ou à risque d'infection par le VIH, ainsi qu'à décrire de nouvelles variantes car nous étudions de nouvelles populations de femmes, dont les Inuit. Des mutations non-synonymes au niveau du gène E6 du VPH52 pourraient influencer sur la capacité de la protéine E6 à lier et dégrader p53, et ainsi déterminer des variantes avec un potentiel oncogénique plus élevé pouvant mener au développement de CIN2,3 ou de cancer du col utérin. De plus, un polymorphisme dans le LCR pourrait influencer sur la liaison des facteurs de transcription viraux et cellulaires. Les polymorphismes pourraient donc modifier le risque de CIN2,3 ou de cancer.

Article

Cet article a été accepté pour publication dans le journal IJC en septembre 2012. [Epub], non édité à la date de rendu du mémoire final.

Human papillomavirus type 52 polymorphism and high-grade lesions of the uterine cervix.

Running title: HPV52 polymorphism and cervical lesions.

Aurélien Formentin¹, Jacques Archambault², Anita Koushik³, Harriet Richardson⁴, Paul Brassard⁵, Eduardo L. Franco⁴, Francois Coutlée^{1,4,6*}.

1- Centre de Recherche et Département de Microbiologie Médicale et Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Qué., Canada.

2- Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada

3- Département de Médecine sociale et préventive, Université de Montréal, Canada

4- Division of Cancer Epidemiology, McGill University, Montreal, Que., Canada.

5- Division of Clinical Epidemiology, McGill University, Montreal, Que., Canada.

6-Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada.

Address correspondence to: François Coutlée, Département de Microbiologie et Infectiologie, Hôpital Notre-Dame du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke est, Montréal (Québec), H2L 4M1, Canada. Tel. 514-890-8000, 25162; fax: 514-412-7512.

Abstract word count: 244

Article word count : 4027

Table count: 2 and Figure count: 3

Reference count: 48

Key words: HPV, cervical dysplasia, cervical cancer, anogenital cancer, viral polymorphism.

ABSTRACT

The association between polymorphism of human papillomavirus type 52 (HPV52) and high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2,3) was investigated in Canadian women. HPV-52-positive endocervical specimens collected from 216 women selected from a total of 3614 participants recruited in two case-control and two cohort studies conducted in Canada, were further analyzed by PCR-sequencing of the LCR and E6 gene. Overall, the HPV52 LCR prototype was detected more frequently in Caucasian women (69 out of 132, 52.3%, 95% confidence interval (CI): 43.8%-60.6%) than in non-Caucasian women (15 of 48, 31.3%, 95% CI 19.9%-45.4%). In two cohort studies, HPV52 prototype was detected in 7 of 15 (46.7%, 95% CI 24.8-69.9) HPV52 persistent infections and 14 of 35 (40.0%, 95% CI 25.5-56.5) transient infections ($p=0.76$). In two case-control studies, 30 participants did not have CIN, 18 had low-grade CIN (CIN1), 64 had CIN2,3, 7 had cervical cancer and the diagnosis was undefined for 27 women. Variant MTL-52-LCR-02 was detected more frequently in women with cancer (28.6%, 95% CI 7.6%-64.8%) than in women without cancer or CIN2,3 (0%, 95% CI 0.0%-9.2%; $p=0.015$). CIN2,3 risk was significantly associated with a deletion at nucleotide position 7695 in the LCR (OR 4.9, 95% CI 1.2-20.8), the T7744C variation in the LCR (OR 5.7, 95% CI 1.1-32.0), and the K93R variation in E6 (OR 6.9, 95% CI 1.3-36.8), after adjusting for age, detection of HPV16 or 18 and study site. These findings indicate that HPV52 polymorphism influences risk of CIN-2,3 and possibly invasive cancer.

Brief description. The association between polymorphism of HPV52 and high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2,3) was investigated in 216 Canadian women selected from a total of 3614 participants in epidemiological studies. CIN2,3 risk was significantly associated with a deletion at nucleotide position 7695 in the LCR (OR 5.7, 95% CI 1.2-27.9), the T7744C variation in the LCR (OR 6.9, 95% CI 1.1-36.8), and the K93R variation in E6 (OR 6.9, 95% CI 1.3-36.8), after adjusting for confounders.

Introduction

High-risk human papillomavirus (HPV) genotypes cause virtually all cases of cancer of the uterine cervix. However, only a minority of women infected with high-risk HPV will develop persistent infection that could cause cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 (CIN2,3), the precursor lesions to cervical cancer ¹. Risk of CIN2,3 is also affected by viral, environmental and host factors, which are thought to play a mediating role in cervical carcinogenesis ². HPV has co-evolved through time with humans into distinct genotypes ^{3;4}. The HPV genome of each genotype is further diversified into variants through cumulative DNA variations resulting in less than a 5% difference in the variant nucleotide sequence of a same type. Epidemiological evidence suggests that HPV genome polymorphism could contribute to viral pathogenicity and oncogenicity ^{4;5}. A better understanding of the association between HPV polymorphism, persistent infection and cervical cancer risk could help explain why only a subset of women with HPV infection develops cervical cancer.

HPV-52 is closely related phylogenetically to HPV-16, the most carcinogenic genotype in the development of cervical cancer and other HPV-associated cancers. In North American and world-wide case-control studies, HPV52 ranked amongst the sixth most frequently detected high-risk genotypes in CIN3 and invasive cervical cancer ⁶⁻⁸. HPV52 was also amongst the most frequent high-risk genotypes detected in CIN2,3 and cervical cancer in Canadian women ⁹. In sexually active women at risk of or infected with HIV, HPV52 polymorphism of the long control region (LCR), a regulatory segment of the HPV genome, was associated with persistence of HPV52 infection, a surrogate marker for CIN2,3 ¹⁰. The role of HPV52 polymorphism in CIN2,3 and cancer is

unknown. If HPV52 polymorphism is indeed a determinant of persistence of HPV52 infection, it may also be associated with progression to cervical lesions.

The aims of the current study were to describe HPV52 polymorphism in Canadian women without a history of immunosuppression, to investigate in women enrolled in two cohort studies the association between HPV52 polymorphism and persistent HPV52 infection, and to investigate in two case-control studies conducted in Canada the association between HPV52 polymorphism and CIN2,3 or cancer of the uterine cervix, controlling for confounders.

Materials and methods

Study sites and design. We used cervical cytobrush samples obtained from 216 (6.0%) women positive for HPV52 among 3614 subjects participating in four epidemiological studies in Canada: the HPV-HSV study (n=20), the “Biomarkers of Cervical Cancer Risk” (BCCR) study (n=126), a cohort of Inuit women (n=34) and the McGill-Concordia cohort study (n=36). The HPV-HSV study is a case-control study of the associations between Herpes simplex virus and HPV in CIN and cancer conducted in Montreal, that enrolled 439 women (50 cancers, 65 CIN2,3, 80 CIN1, 244 normal cervix) ¹¹. The BCCR is a case-control study of 2000 women in Montreal of biomarkers associated with CIN2,3 and cervical cancer (987 normal, 65 CIN1, 488 CIN2,3, 213 cancers, 247 undefined or missing status) ¹². In both studies, controls included women with current and previously normal annual routine Pap smears, while cases had histologically-confirmed CIN or cancer. The McGill-Concordia cohort was conducted on 621 young women (median age of 21 years) living in Montreal to investigate the natural history of HPV infection ¹³. The Inuit cohort recruited 554 Inuit women living in Nunavik (mean age of 35.5 years),

northern Quebec, to assess determinants of high-risk HPV infection persistence ^{14;15}. Participants in the two cohort studies were followed prospectively as described elsewhere to study HPV persistence ^{13;15}. Informed consent was obtained from all study participants for HPV analysis and other study procedures. Ethics committees from each participating institution approved procedures and consent forms.

Exfoliated cervical cells were collected with a cytobrush and processed with QIAamp columns (QIAGEN Inc., CA, USA) ¹³ or with Master pure™ (Epicentre, Madison, WI) ^{11;12;15}. Five µl of extracted DNA was amplified for HPV detection using MY09-MY11-HMB01 ¹³ or PGMY ^{11;12;15} primers and typed with the Line blot or the Linear array assays (Roche Molecular systems, CA) ¹⁶. Samples reactive in the linear array with the cross-reactive probe for HPV52 were further tested with a validated HPV-52-specific real-time PCR assay ¹⁷.

Analysis of HPV52 LCR, E6 and E7 by PCR-sequencing. One sample from all HPV52-positive participants was further tested for HPV-52 polymorphism. PCR-sequencing of the 3' end of the LCR (primers LCR-1-F 5'-TTGCACCCACATGAGTAACA-3' (nucleotide (nt) position 7873-7892) and LCR-1-R 5'-AGTGCACACCTGGTGAGTAA-3' (nt position 7393-7413)) and of the complete E6 gene (primers 52-E6-F 5'-GAACACAGTGTAGCTAACGCACG-3' (nt position 76-98) and 52-E6-R 5'-GCATGACGTTACACTTGGGTCA-3' (nt position 535-556)), was done according to previously described protocols ¹⁸.

When this amplification protocol failed, a nested PCR was performed. After 60 cycles of amplification with the LCR primers as described above, 10 µl of PCR products was amplified with nested primers LCR-3-F (5'-GCTCCTAATCTATTGCATCTCC-3' (nt position 7421-7442)) and 52-LCR3-R (5'-ACAAGACATATTTGGCGTAGG-3' (nt

position 7833-7853)) in a master mix containing 2.0 mM MgCl₂ at 94°C for 4 min followed by 62 cycles at 95°C (30 sec), 56°C (30 sec) and 72°C (30 sec). Specimens negative despite these two protocols were retested with two sets of primers generating overlapping LCR amplicons. One fragment was generated with primers 52-LCR1-F and 52-LCR2-R (5'-GCGGGACAACAAGTGTAGAC -3' (nt position 7666-7685)) with 2.0 mM MgCl₂ at 95°C for 4 min followed by 50 cycles at 95°C (30 sec), 55°C (30 sec) and 72°C (30 sec), and the second fragment was generated with primers 52-LCR2-F 5'-ACTTTGGTTGTCCTTGGC-3' (nt position 7580-7597) and 52-LCR1-R with 2,0 mM MgCl₂ at 95°C for 4 min followed by 50 cycles at 95°C (30 sec), 57°C (30 sec) and 72°C (30 sec).

The PCR-amplified HPV52 DNA product size was confirmed by gel electrophoresis and the amplicon was purified with the QIAquick gel extraction kit protocol (Qiagen Inc, Mississauga, ON). Direct double-stranded PCR-sequencing was performed for LCR and E6 amplicons with the same primers described above using the fluorescent cycle-sequencing method (BigDye terminator ready reaction kit; Perkin-Elmer) on 10 ng of purified amplicons. Cycling parameters were 96°C for 1 min followed by 25 cycles for 10 s at 96°C, 5 s at 50°C, and 4 min at 60°C. Sequence analysis was performed on an ABI Prism 3100 genetic-analyzer system. Non-prototypic isolates were sequenced at least twice to exclude *Taq*-induced errors. Isolate sequences were aligned for classification by use of CLUSTAL W (version 1.8) ¹⁹. The HPV-52 prototype (Genbank accession number X74481) corresponds to the isolate initially sequenced ^{20;21}. The sequencing error noted previously at nt positions 7387-7391 of the prototype was outside the regions that we amplified in HPV52 LCR ²². Electrophoregrams for each of LCR and E6 amplicons generated with these protocols clearly revealed the presence of

only one HPV52 variant sequence per sample (data not shown). The evolutionary relationship among the HPV52 LCR variants was explored with a phylogenetic based on the neighbor-joining algorithm by using the Mega version 2.1. Four different lineages (A, B, C and D) of HPV52 have been defined in a study on isolates collected from multiple geographic regions²⁴. Lineage A is divided into sub-lineages A1 and A2 as these diverge early. To assess the effect of LCR variations on putative binding sites for cellular proteins, the TFSEARCH software was used²³. GenBank accession numbers for HPV52 LCR variants in our study are from JQ293013 to JQ293062 and for HPV52 E6 variants from JQ293063 to JQ293084.

Data analysis. The investigation of the relationship between ethnicity and HPV-52 LCR polymorphism was conducted on 180 participants for whom this information and LCR sequence data were available. The significance of the difference between races of proportion of participants infected with a HPV52 variant was established with a Fisher's exact test. The association between HPV52 polymorphism and persistence was investigated in women participating in the two cohort studies with at least three completed visits. Women with HPV52-positive cervical samples on > 2 visits had a persistent infection. The proportion of women infected with the HPV52 prototype was compared between participants with transient and persistent infection with a Fisher's exact test. The investigation of the association between HPV52 polymorphism and CIN2,3 or cancer was conducted on participants recruited in the two case-control studies, since these studies included all women with CIN2,3 and cancer. The presence and grade of CIN was established by histopathology of cervical biopsies^{11;12}. Women were CIN-free if they had a normal cervical biopsy or had a normal Pap smear at accrual and had no previous abnormal smears based on their medical chart information. CIN1 is not

considered a precursor lesion to cervical cancer but a morphologic consequence of HPV infection. In these analyses, controls included women without CIN or with CIN1 and were designated as <CIN2,3. The rate of detection of HPV52 variants in women recruited in the two case-control studies were thus compared between 64 women with CIN2,3 and 48 women with <CIN2,3 (30 CIN-free, 18 CIN1). The association between HPV52 polymorphism and CIN2,3 was first investigated by classifying isolates into variant lineages and variants. The magnitude of the associations between HPV52 variants with CIN2,3 or cancer was assessed by calculating odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (CI). The association between CIN2,3 or cancer and HPV52 polymorphism was assessed individually for each of the variations of the HPV52 variants significantly associated with disease in the preliminary analysis. Fisher's exact test was used to assess the significance of the differences between dichotomous variables and a Mann-Whitney test was used to assess the significance of the differences of age between groups. Unconditional multiple logistic regression analysis was performed to obtain maximum likelihood estimates of the OR while controlling for the confounding effects of study site, age and HPV16 or 18 infection. Statistical analyses were performed with STATISTICA version 6 software (StatSoft, Tulsa, OK).

Results

Overall, 216 (6.0%) of 3614 participants from four studies provided at least one cervical specimen containing HPV52 DNA. The demographics, distribution of participants according to study site and grade of cervical disease, as well as HPV16 or 18 infection are shown in Table 1. The grade of cervical disease was established for 177 participants by histopathology (7 cancers, 64 CIN2,3, 18 CIN1) or cytology (85 without SIL, 3 low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)). The gynecological investigation to assess the grade cervical disease was not completed for 27 participants in the BCCR. A cytology smear was not obtained for 12 participants in the Inuit cohort. The median age of participants was 26 years. One hundred and thirty nine women (64.4%) were Caucasian, 34 (15.7%) were Inuit, 11 (5.1%) were of African origin, 5 (2.3%) were Asian, and 27 (12.5%) were of unknown ethnicity. Overall, 61 women had never smoked tobacco, 124 had ever smoked (45 were current smokers) and 31 had unknown smoking habits. HPV52 was the only type detected in 59 (27.3%) participants. When the two case-control studies were compared, there was a significantly greater proportion of participants having CIN1 in the HSV/HPV study, and of participants having incomplete files in the BCCR. When the two cohort studies were compared, a greater proportion of Inuit women were recruited and a greater proportion of women were lost to follow-up in the Inuit cohort (Table 1).

HPV52 genomic polymorphism of the LCR and E6. Figures 1a and 1b display the site and nature of variations in the LCR and E6, and the change in amino acid sequence in E6 compared to the HPV52 prototype. Several variations in the LCR and E6 co-segregated (data not shown). Overall, 34 non-prototypic variants in the LCR and 16 non-prototypic variants in E6 were identified. Not all prototypic LCR isolates were E6 prototypes. Of the

98 isolates classified as the LCR prototype, 6 were classified as a MTL-52-E6-05 variant and one was classified as a MTL-52-E6-01 variant. When LCR and E6 sequences were combined, 91 (44.6%, 95% confidence interval (CI) 38.0-51.5) of 204 isolates with complete LCR and E6 sequences were HPV52 prototypes. The HPV52 prototype was the most frequently detected variant (Figure 1). There was an average of 4.7 ± 5.1 (median, 3) and of 1.8 ± 0.9 (median, 1.5) variations per LCR and E6 variants, respectively. In the LCR, 40 (83.3%) of 48 variations modified binding sites for transcription factors (data not shown). Six of the 17 variations (35.3%) in E6 resulted in an amino acid change (Figure 1).

HPV52 polymorphism and ethnicity. We first investigated the relationship between ethnicity and HPV-52 LCR polymorphism for 189 women for whom ethnicity was known. HPV52 LCR sequences were not obtained with PCR-sequencing for 9 participant, leaving 180 women for this analysis. The HPV52 LCR prototype was significantly detected more commonly in Caucasian women (69 out of 132, 52.3%, 95%CI: 43.8%-60.6%) than in non-Caucasian women (15 of 48, 31.3%, 95% CI 19.9%-45.4%; $p=0.02$). On the other hand, variant MTL-52-LCR-04 was detected more frequently in non-Caucasian women (19 of 48, 39.6%, 95% CI 27.0%-53.7%) than in Caucasian women (18 of 132, 13.6%, 95% CI 8.7%-20.6%; $p=0.0003$), mainly because of the prevalence of this variant in Inuit women (18 of 32, 56.3%, 95% CI 39.2%-71.9%). The evolutionary relationship among the 35 HPV52 LCR variants is depicted in Figure 2. The majority of isolates belonged to lineage A. Isolates from Inuit women were exclusively from sub-lineage A2, a difference that was statistically significant (32 of 160 (20%, 95% CI 14.5%-26.9%) versus 0 of 20 (0%, 95% CI 0.0%-18.9%), $p=0.03$).

HPV52 polymorphism and HPV52 persistence. The association between HPV52 polymorphism and persistence was investigated by comparing the proportion of women infected with the prototype having persistent (n=15) and transient (n=39) infections. HPV52 LCR sequences could however not be obtained from 4 participants with transient infections. Overall, 7 of 15 (46.7%, 95% CI 24.8-69.9) women with persistent infection and 14 of 35 women (40.0%, 95% CI 25.5-56.5) with transient infection were infected by the HPV52 prototype, a difference that was not statistically significant (p=0.76). Individual variations could not be investigated as the number of women studied was too small for each variation (data not shown). The variation at nt position 7624, resulting in the loss of a putative binding site for the C/EBP protein that had been associated previously with HPV52 persistence¹⁸, was not associated with persistence in this study being detected in 6 of 15 (40%, 95% CI 19.8-64.3) of persistent and 17 of 35 (48.6% 95% CI 33.0-64.4) transient infections (p=0.76).

HPV52 polymorphism and CIN2,3. In the following analyses, the rate of detection of HPV52 variants were compared between 64 women with CIN2,3 and 48 women with <CIN2,3 (see methods section). Older women (OR 1.1, 95% CI 1.0-1.2) but not those with a history of smoking (OR 1.0, 95% CI 0.5-2.0) were at increased risk for CIN2,3 (Table 2). Most of the participants in this analysis were Caucasian women. HPV16 and/or HPV18 DNA was detected more frequently in HPV52-positive women with CIN2,3 than in HPV52-positive women with <CIN2,3 (Table 2). The number of HPV genotypes per sample was similar between participants with CIN-2,3 (median of 3 genotypes) and those with <CIN2,3 (median of 2 genotypes) (OR 1.1, 95% CI 0.9-1.4; p=0.34).

HPV52 LCR and E6 sequences could not be obtained with PCR-sequencing from 2 women with CIN2,3 and 2 women with <CIN2,3. Controlling for study site, age and

HPV16 or 18 DNA, detection of variant MTL-52-LCR-21 (OR 10.5, 95% CI 1.2-95.5; $p=0.04$) was significantly associated with CIN2,3. We investigated if variations of variant MTL-52-LCR-21 were individually associated with CIN2,3, considering as the referent category women infected with HPV52 variants not carrying any of the variations of variant MTL-52-LCR-21 (including the prototype). A deletion at nt position 7695 (OR 4.9, 95% CI 1.2-20.8) and a variation at nt position 7744 (OR 5.7, 95% CI 1.1-32.0) were significantly associated with CIN2,3 (Table 2). The deletion resulted in the loss of a binding site for the human activator AP-1 while the T7744C variation resulted in the addition of a binding site for the cellular transcription factor Oct-1. The variation at nt position 7624, resulting in the loss of a putative binding site for the C/EBP protein that had been associated with HPV52 persistence ¹⁸, was not associated with CIN2,3 in the current work (OR=1.0, 95% CI 0.5-2.1, $p=0.94$). The MTL-52-LCR-21 variant had only one non-synonymous variation in the E6 gene (variants MTL-52-E6-13 and MTL-52-E6-17) at nt position 379 (K93R). K93R was independently associated with CIN2,3 (Table 2). We could not include together these three variations associated with CIN2,3 in a multivariate model as they co-segregated almost completely (data not shown).

HPV52 polymorphism and invasive cervical cancer. HPV52 was the only type detected in one of 7 women with cancer. The association between HPV52 polymorphism and invasive cancer was then assessed using as a control group women with <CIN2,3. Variant MTL-52-LCR-02 was detected slightly more frequently in women with cancer (2 of 7 (28.6%, 95% CI 7.6%-64.8%)) then in women with <CIN2,3 (0 of 46 (0.0%, (95% CI 0.0%-9.2%); $p=0.015$), although the number of participants with cancer was small. Age (OR 1.1, 95% CI 1.0-1.17) but not ethnicity and smoking was minimally associated with cervical cancer. Multivariate analysis could not be conducted because of the small

number of cases with cancer. HPV52 E6 polymorphism was not associated with cancer (data not shown).

Discussion

In this report, we have characterized sequence variations in the LCR and E6 gene of 216 HPV52 isolates from Canadian women with various grades of CIN. We had shown previously that HPV52 polymorphism in the LCR, but not in the viral capsid gene, was associated with persistence of HPV52 infection^{10;25}. Consistent with this finding, we now report that HPV52 polymorphism mediates risk of CIN2,3. A few studies had examined HPV52 polymorphism in the anogenital tract^{10;18;22;24-31}. Most of these publications were descriptive or analyzed intra-type evolution^{18;22;24;26-29}. One recent study conducted on Asian women concluded that HPV52 variants of lineage C increased the risk of CIN3 and cancer³⁰. Although all cases of CIN3 and cancer in a population-based case-control study in Central America clustered in variant lineages A, B and C, the power of the study was limited by the small number of participants with disease. Nevertheless, the association between HPV polymorphism of types in the alpha species other than type 16 and HPV persistence was significant³¹.

The analysis of HPV52 variants was refined by targeting the LCR, a hypervariable non-coding segment of the HPV genome⁵. Non-coding regions are less restricted in their ability to accumulate and tolerate variations²⁴. As described for other types, HPV52 molecular variants did not evolve from random mutational events since variation sites and combinations of variations were shared by several isolates and variants^{4;5;22;24}. We report two non-synonymous variations in HPV52 E6 that are shared by another genotype. Thus, the E6 L83V variation had been described previously for HPV16, HPV52 and HPV33

^{5;18;27;32-34}. This variation was shown by some to be associated with HPV16 persistence and CIN2,3, although this remains controversial ^{5;34;35}. The significance of this variation in HPV52 remains uncertain ^{18;29;30}. The E6 E14D variation reported in HPV16 was also found in HPV-52 in the current study ³⁶. Inuit women were infected with lineage A variants and not with lineage B or C variants that are more often found in Asian women ³⁰. In our study, the HPV52 prototype was detected more frequently in Caucasian women. The association between ethnicity and HPV polymorphism has been demonstrated previously for several HPV genotypes ^{5;22;28;37;38}.

In the current study, variations in the LCR and E6 influenced CIN2,3 risk, controlling for potential confounders. Because of the strong co-segregation of these variations, it was impossible to determine if they were individually responsible for the variation in risk of CIN2,3. HPV16 LCR polymorphism has been shown to confer a higher risk of developing persistent HPV infection, CIN2,3 or cancerous anogenital lesions ^{4;5;34;35;38-41}. A variation in the HPV33 LCR at nt position 7732, resulting in the loss of a putative binding site for USF, was found to be associated with CIN2,3 ⁴². Since transcription of HPV oncogenes is under the control of promoter and enhancer elements in the LCR, variations within these motifs may alter the replication and transcription of HPV52 ^{5;35;43} by abolishing, creating or modifying the affinity of a binding site for a cellular factor ^{44;45}.

The LCR variation at nt position 7744 associated with CIN2,3 resulted in a new binding site for the ubiquitous cellular transcription factor Oct-1 ⁴⁶. Oct-1 activates the epithelial-specific HPV16 enhancer by stabilizing the binding of a nuclear factor to the composite element, which in turn results in higher levels of enhancer activity ⁴⁷. The increased binding of Oct-1 to the LCR could result in increased transcriptional activity of

HPV52. The deletion at nt position 7695 in HPV52 LCR resulted in the loss of the second binding site for the human activator AP-1. However, AP-1 is a Jun/Fos heterodimer complex protein that activates transcription of E6 and E7 genes ⁴⁸. Mutations in the second site for AP-1 binding have been shown in vitro to reduce HPV31 transcription to a lesser extent than mutations in the first binding site ⁴⁸. Also, the presence of a potential recognition sequence does not mean that it will always be bound by its cognate transcription factor. Alternatively, variations in the LCR may co-segregate with variations in HPV genes involved in replication, activation or transforming capacity of HPV52 genome that could be responsible for increased pathogenicity ⁵. In vitro assessment of which factors bind the LCR in any given transcriptional environment are required to confirm the predicted effects of LCR variations. In our previous study in women at risk or infected with HIV, non-prototypic HPV52 variants with a variation at nt position 7624 resulting in the loss of a putative binding site for the C/EBP protein increased the risk for persistent HPV52 infection ¹⁰. This variation was not associated with CIN2,3 in immunocompetent women.

The non-synonymous variation K93R in HPV52 E6 significantly predicted variations in CIN2,3 risk. A study conducted in Asian women reported an association between HPV52 variant lineage B and CIN3+ but did not report if E6 variations were responsible for the association ³⁰. The effect on the function of E6 of this variation should be assessed in vitro. Amino acid change(s) in E6 can alter the ability of E6 to bind and degrade p53, induce antiapoptotic signals or alter their binding affinity with host HLA ⁵. HPV16 E6 polymorphism has been shown, although inconsistently, to be associated with CIN or cervical cancer, ^{4;34;35;41}.

Our study was limited by the small number of HPV52-positive women with invasive cancer or followed prospectively to study viral persistence. Since the different designs between studies which provided the samples analyzed in this study could have introduced a bias, we chose to investigate the association between CIN2,3 or cancer only in women participating in the two case-control studies. We have also controlled for the site of recruitment by multivariate analysis. Another caveat of our work is the fact that the outcome definition for the control group was based on cytology for several participants. However, two consecutive normal Pap smears in women who cleared HPV52 infection were required, reducing the likelihood of misclassification. Despite the fact that HPV52 was often detected with other HPV genotypes, the number of HPV types was not associated with CIN2,3 and the association between HPV52 polymorphism and CIN2,3 remained significant controlling for HPV16 or 18 detection. It is not clear from our study considering the high rate of multiple type infections in women with CIN2,3 or cancer, if HPV52 polymorphism acts directly on carcinogenesis (in cases where the lesion is caused solely by HPV52) or as a cofactor for cases where several types or a type other than HPV52 causes the lesion. This should be investigated in further studies by testing biopsy samples instead of exfoliated cells.

This study suggests that polymorphism of HPV52 plays a role in CIN2,3. Larger multicentric international studies should help be confirm if these results can be reproduced in different populations. Since variations associated with CIN2,3 and cancer were different, the analysis of the other genes of HPV52 are needed to determine whether these associations are explained by a direct effect of LCR or E6 variations on HPV infection or by co-segregation of these variations with mutations in other genes of

HPV52. This investigation should also be complemented by functional studies of variant genomes.

Acknowledgement.

This study was supported by the Cancer Research Society of Canada. Optimization of HPV52 sequencing was supported by the Réseau FRSQ SIDA-MI and by a Team Grant on HPV by the Canadian Institutes for Health Research. PB was supported by a clinician researcher career award from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

The authors do not declare any conflict of interest related to the topic of this article. Eduardo Franco has provided occasional advisory board service to GSK, Merck Sharp Dome, Roche and Gen-Probe. Francois Coutlée has received grants through his institution from Merck and Roche, as well as honoraria from Merck and Roche for lectures on HPV.

Table I. Demographics of the HPV52-positive women studied in four studies.

Factor	Case-control studies (%)		Cohort studies (%)	
	BCCR N=126	HSV/HPV n=20	McGill/Concordia n=36	Inuit n=34
Age (years)				
Mean±SD	31.2±9.4	30.9±11.7	23.7±5.1	24.9±9.1
Median	28	27	23	22
Ethnicity (no. of women)				
Caucasian	90 (71)	20 (100)	29 (81) ^a	0 (0) ^a
African	6 (5)	0 (0)	5 (14)	0 (0)
Asian	3 (3)	0 (0)	2 (5)	0 (0)
Inuit	0 (0)	0 (0)	0 (0) ^a	34 (100) ^a
Unknown	27 (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Smoking (no. of women)				
Never	36 (29)	2 (10)	15 (42)	8 (24)
Ever	62 (49)	17 (85)	20 (56)	25 (75)
Unknown	28 (22)	1 (5)	1 (2)	1 (3)
HPV16+ (no. of women)				
	29 (23)	6 (10)	8 (22)	2 (6)
HPV18+ (no. of women)				
	10 (8)	1 (5)	2 (6)	3 (9)
Cervical disease (no. of women)				
Normal	29 (23)	1 (5)	34 (94)	21 (62)
CIN1/LSIL	9 (7) ^b	9 (45) ^b	2 (6)	1 (3)
CIN2,3	56 (44)	8 (40)	0 (0)	0 (0)
Cancer	5 (4)	2 (10)	0 (0)	0 (0)
Undefined	27 (22) ^{c,f}	0 (0) ^c	0 (0) ^d	12 (35) ^d
Persistence (no. of women)				
Persistence	nd	nd	10 (28)	5 (15)
Transient	nd	nd	23 (64)	16 (47)
Undefined	nd	nd	3 (8) ^e	13 (35) ^e

Significant differences between the two cohort studies and the two case-control studies are indicated with letters from a to e = a: $p<0.001$, b: $p=0.001$, c: $p=0.03$, d: $p=0.02$, e: $p=0.004$. The other comparisons between each cohort or case-control studies were not significant ($p>0.05$). SD: standard deviation. BCCR: Biomarkers of Cervical Cancer risk study; HPV-HSV: HPV-Herpes simplex co-infection cross-sectional study. Normal women included those without CIN on a biopsy ($n=30$) or those with repeated normal cytology smears ($n=55$). CIN1 ($n=18$), CIN2,3 ($n=64$) and cancer cases ($n=7$) were proven by histopathology in case-control studies and by cytology (LSIL, $n=3$) in cohort studies. f: the gynecological investigation of these participants was not available.

Table II. Association between HPV52 polymorphism and CIN2/3 in 112 women.

Variable	No. of isolates with Disease grade (%)		crude OR	adjusted OR
	<CIN2,3 (n=48)	CIN2,3 (n=64)	(95% CI)	(95% CI)
Age (years, median)	24	29	1.07 (1.0-1.1)	1.1 (1.1-1.2)
Ethnicity	n=48	n=64		
Caucasian	43 (90)	60 (94)	1.0 (referent)	nd
Non-caucasian	5 (10)	4 (6)	0.6 (0.2-2.3)	nd
Smoking habits (%)^a	n=48	n=64		
Never	14 (32)	21 (33)	1.0 (referent)	nd
Ever	34 (65)	41 (64)	1.0 (0.5-2.0)	nd
Unknown	0 (3)	2 (3)	nd	nd
HPV16 or 18 detection	n=48	n=64		
Negative	39 (81)	41 (64)	1.0 (referent)	nd
Positive	9 (19)	23 (36)	2.4 (1.0-6.0)	4.7 (1.3-17.2)
Number of HPV types per sample				
No. of types (median)	2	3	3.3 (0.8-14.2)	nd
<u>LCR Variations</u>	n=46 ^b	n=62 ^b		
Referent variants	28 (61)	33 (53)	1.0 (referent)	1.0 (referent)
Deletion 7695	3 (7)	12 (19)	3.4 (0.9-13.5)	4.9 (1.2-20.8)
7744 (C for T)	2 (4)	9 (15)	3.8 (0.8-19.6)	5.7 (1.1-32.0)
<u>E6 variations</u>	n=46 ^c	n=61 ^c		
Referent variants	28 (61)	33 (53)	1.0 (referent)	1.0 (referent)
K93R	2 (4)	11 (18)	4.7 (1.0-23.5)	6.9 (1.3-36.8)

Women with <CIN2,3 did not have CIN or had CIN1. Referent variants included the prototype and all HPV52 variants that did not carry any of the variations detected in MTL-52-LCR-21 variant. Odds ratio (OR) estimates and 95% confidence intervals (CI) were obtained from logistic regression (crude). Adjusted OR were adjusted for study site, age, ethnicity and HPV16 or 18 infection. a: information was incomplete in questionnaire for some participants. Totals of participants were different between LCR and E6 analyses because of differences in rates of positivity by PCR-sequencing between these regions of HPV52 genome; b: for the LCR, 2 samples from women without CIN and 2 from women with CIN2,3 could not be analyzed by PCR sequencing; c: for E6, 2 samples from without CIN and 3 women with CIN2,3 could not be analyzed by PCR-sequencing.

1a) LCR variations (nucleotide positions).

Variation at nucleotide position

[illegible]

Sequence variations in the 3' end of the long control region (LCR) of 204 human papillomavirus type 52 isolates. Of the 216 HPV52-positive specimens, complete sequences of the 3' end of the LCR were obtained for 201 samples, partial sequences were obtained for 3 additional samples and 9 could not be analyzed by PCR-sequencing, leaving 204 specimens for HPV-52 molecular variant analysis of the LCR. LCR nucleotide positions where variations were detected are written across the top vertically. Positions for which no variation was encountered, compared with the prototype, are marked with a dash, whereas a letter showing the mutated base indicates a variation site for that variant. The designation of variants was arbitrary. The 11-bp deletion was TTCTTGCTGAC. D, deletion; I, insertion. Frequency is for the number of isolates identified for each variant. LCR variants MTL-52-LCR-02 to MTL-52-LCR-24 (corresponding to variants JA-2 to JA-24) and MTL-52-LCR-28 had been described previously^{10;18;30} while variants MTL-52-LCR-28 to MTL-52-LCR-48 and MTL-52-LCR-50 had not been reported before.

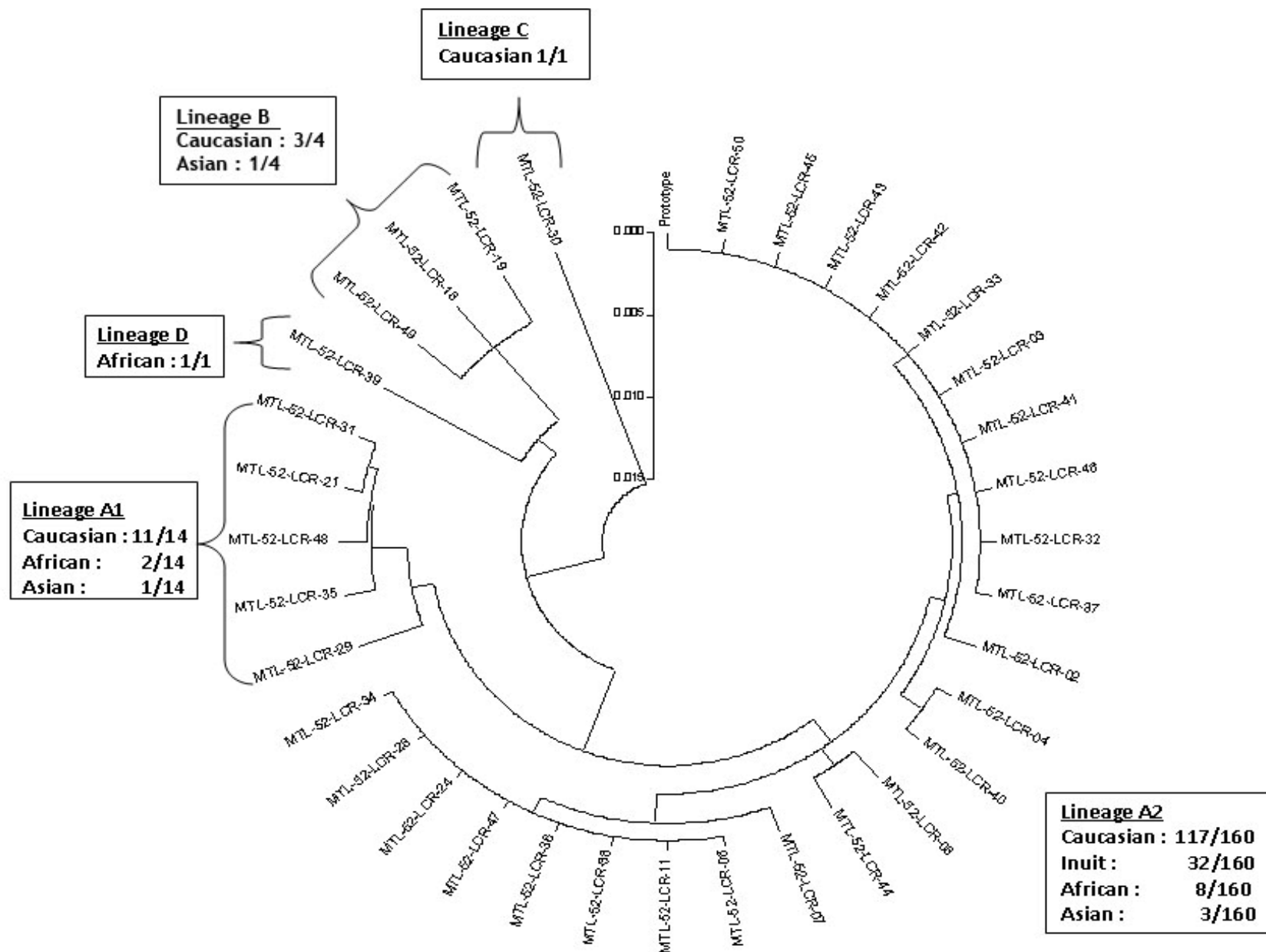
1b) E6 variations (nucleotide positions)

Variation at nucleotide position

	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	5		
	2	4	4	7	0	3	5	0	4	5	5	7	7	9	0	0	2	3		
	3	0	3	1	0	7	1	9	8	0	6	5	9	0	4	5	0			
X74481 (ref)	C	C	A	C	C	C	A	T	C	G	G	G	A	A	T	G	A			
variation	A	T	C	G	T	T	G	C	G	T	A	T	G	G	C	T	G			
Prototype																		0		122
MTL-52-E6-01	A																	1		1
MTL-52-E6-02															C			1		2
MTL-52-E6-03				G														1		32
MTL-52-E6-04												T						1		1
MTL-52-E6-05			C									T						2		20
MTL-52-E6-06					T	T				T							T	4		1
MTL-52-E6-12										T			G					2		3
MTL-52-E6-13							G						G					2		13
MTL-52-E6-14									G	T							G	3		1
MTL-52-E6-16										T								1		1
MTL-52-E6-17													G					1		2
MTL-52-E6-18				G										G				2		1
MTL-52-E6-19		T																1		1
MTL-52-E6-20										T	A		G					3		1
MTL-52-E6-21						T												1		1
MTL-52-E6-22						T		C										2		1
Codon position	8	13	14	24	33	46	50	70	83	83	85	92	93	97	101	108	143			
Wild-Type AA	cga	cac	gaa	cat	tgc	cta	tta	tta	ctg	ctg	ggg	gta	aaa	agt	att	acg	cga			
Mutated AA	aga	cat	gac	gat	tgt	tta	tgg	cta	gtg	ctt	gga	tta	aga	ggt	atc	act	cgg			
Wild-Type AA	R	H	E	H	C	L	L	L	L	L	G	V	K	S	I	T	R			
Mutated AA	R	H	D	D	C	L	L	L	V	L	G	L	R	G	I	T	R			

The complete sequence of E6 was obtained for 205 isolates, partial for one isolate and 10 isolates could not be analyzed. The change in amino acid is provided: AA is for amino acid.

Figure 2. Intratype diversity of HPV52 LCR.



A phylogenetic tree of 35 LCR variant sequences including the prototype was constructed using the neighbor-joining algorithm. The bar represents substitution per 100 bases. Ethnicity of 23 participants was unknown. The ethnic origin of participants is provided for each lineage in boxes. Lineages were derived from Chen et al. from ²⁴.

Reference List

1. Ferenczy A, Franco EL. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncology* 2002;3:11-16.
2. Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl.Cancer Inst.Monogr.* 2003;35-40.
3. Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, Desalle R, Burk RD. Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* 2005;79:7014-23.
4. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 2006;118:1071-76.
5. Giannoudis A, Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 2001;193:295-302.
6. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J.Natl.Cancer.Inst.* 2009;101:475-87.
7. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Wentzensen N, Gravitt PE. Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer.Epidemiol.Biomarkers.Prev.* 2010;19:1675-81.
8. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de-Sanjose S, Hammouda D et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004;111:278-85.

9. Coutlée F, Ratnam S, Ramanakumar AV, Insinga RP, Bentley J, Escott N et al. Distribution of Human Papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Canada. *J Med Virol* 2011;83:1034-41.
10. Aho J, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Pourreaux K, Rouah F et al. Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J Infect Dis* 2004; 190:46-52.
11. Tran-Thanh D, Provencher D, Koushik A, Duarte-Franco E, Kessous-Elbaz A, Drouin P et al. Herpes Simplex Virus Type II (HSV-2) is not a Cofactor to Human Papillomavirus in Cancer of the Uterine Cervix. *Am J Obstet Gyn* 2003;188:129-34.
12. Koushik A, Ghosh A, Duarte-Franco E, Forest P, Voyer H, Matlashewski G et al. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Det Prev* 2005;29:307-16.
13. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Coutlée F et al. The natural history of type-specific HPV infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 2003;12:485-90.
14. Hamlin Douglas LK, Coutlee F, Roger M, Hanley J, Franco EL, Brassard P. Determinants of human papillomavirus infection among Inuit women of northern Quebec, Canada. *Sex. Transm. Dis.* 2010;37:377-81.
15. Hamlin Douglas LK, Coutlee F, Roger M, Franco EL, Brassard P. Prevalence and age distribution of human papillomavirus infection in a population of Inuit women in Nunavik, Quebec. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2008;17:3141-49.
16. Coutlee F, Rouleau D, Petignat P, Ghattas G, Kornegay J, Schlagg P et al. Enhanced Detection and typing of Human Papillomavirus DNA in Anogenital Samples

with PGMY primers and the LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test. *J.Clin.Microbiol.* 2006;44:1998-2006.

17. Coutlee F, Rouleau D, Ghattas G, Hankins C, Vezina S, Cote P et al. Confirmatory real-time PCR assay for human papillomavirus (HPV) type 52 infection in anogenital specimens screened for HPV infection with the linear array HPV genotyping test. *J.Clin.Microbiol.* 2007;45:3821-23.

18. Aho J, Hankins C, Tremblay C, Lang F, Forest P, Pourreaux K et al. Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *J Infect Dis* 2003;188:1517-27.

19. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 1994;22:4673-80.

20. Shimoda K, Lorincz AT, Temple GF, Lancaster WD. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 1988;69:2925-28.

21. Egawa K, Delius H, Matsukura T, Kawashima M, de Villiers EM. Two novel types of human papillomavirus, HPV 63 and HPV 65: comparisons of their clinical and histological features and DNA sequences to other HPV types. *Virol* 1993;194:789-99.

22. Calleja-Macias IE, Villa LL, Prado JC, Kalantari M, Allan B, Williamson AL et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2005;79:13630-40.

23. Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV et al. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucl Acids Res* 1998;26:362-67.
24. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M et al. Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One* 2011;6:e20183.
25. Gagnon S, Hankins C, Pourreaux K, Franco E, The Canadian Women's HIV study Group, Coutlee F. Polymorphism of the capsid L1 gene is not a determinant of persistence of HPV-52 infection in HIV-seropositive women. *Can j Inf Dis* 2006;17:29A.
26. Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J et al. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 1996;70:3127-36.
27. Xin CY, Matsumoto K, Yoshikawa H, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S et al. Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Letters* 2001;170:19-24.
28. Raiol T, Wyant PS, de Amorim RM, Cerqueira DM, Milanezi NG, Brigido MM et al. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. *J.Med.Virol.* 2009;81:685-92.
29. Ding T, Wang X, Ye F, Cheng X, Ma D, Lu W et al. Distribution of human papillomavirus 58 and 52 E6/E7 variants in cervical neoplasia in Chinese women. *Gynecol Oncol* 2010;119:436-43.

30. Chang YJ, Chen HC, Lee BH, You SL, Lin CY, Pan MH et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2011;129:965-73.
31. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, Hildesheim A et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 2010;70:3159-69.
32. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY et al. Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia in southern China. *J Inf Dis* 2002;186:696-700.
33. Gagnon S, Hankins C, Tremblay C, Forest P, Pourceaux K, Coutlee F. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J Infect.Dis.* 2004;190:1575-85.
34. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, Birembaut P et al. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2006;15:820-22.
35. Nindl I. HPV variants and risk of cervical cancer. *Papillomavirus Report* 2002;13:1-6.
36. van Duin M, Snijders PJF, Vossen MTM, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RHM et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000;81:317-25.

37. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Gonzalez-Guerrero JF et al. Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology* 2004;319:315-23.
38. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Koutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1045-52.
39. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:315-18.
40. Burk RD, Terao M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 2003;63:7215-20.
41. Lee K, Magalhaes I, Clavel C, Briolat J, Birembaut P, Tommasino M et al. Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res* 2008;131:106-10.
42. Khouadri S, Villa LL, Gagnon S, Koushik A, Richardson H, Ferreira S et al. Human papillomavirus type 33 polymorphism and high-grade lesions of the uterine cervix. *J Infect Dis* 2006;194:886-94.
43. Desaintes C, Demeret C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* 1996;7:339-47.
44. Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR. Variable oncogene promoter activity of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia. *J Clin Microbiol* 2001;39:2009-14.

45. Hubert WG. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol* 2005;79:5914-22.
46. Chong T, Apt D, Gloss B, Isa M, Bernard HU. The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* 1991;65:5933-43.
47. O'Connor M, Bernard HU. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virol* 1995;207:77-88.
48. Kyo S, Klumpp DJ, Inoue M, Kanaya T, Laimins LA. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J Gen Virol* 1997;78:401-11.

Discussion

Nos résultats démontrent une association positive entre le polymorphisme viral du VPH52, à la fois dans le LCR et le gène E6, et l'apparition de lésions CIN2,3. En accord avec d'autres études, l'âge était significativement associé avec la présence de cancer du col utérin dans notre population canadienne. En revanche, contrairement à notre première étude portant sur la persistance du VPH52, l'association avec la persistance de l'infection n'a pu être investiguée dans l'étude actuelle vu le nombre trop faible de participantes présentant des infections persistantes. Le VPH52 fait partie de l'espèce $\alpha 9$, tout comme le VPH16. Ces deux types sont donc apparentés génétiquement. Il est reconnu que la persistance de l'infection au VPH16 joue un rôle important dans la carcinogénèse du col utérin (Schiffman et al., 2010). Seules les infections persistantes augmentent le risque de lésions significatives du col.

Le VPH52 se classe parmi les sept types de VPH les plus fréquents détectés en présence d'anomalies cytologiques, de lésions précancéreuses ou de cancer du col utérin. On le retrouve mondialement au 6^{ème} ou 7^{ème} rang mais sa prévalence peut varier selon les pays ou continents. Ainsi, il se classe au 3^{ème} rang des types détectés dans les lésions CIN3 dans une étude réalisée aux États-Unis et se situe parmi les quatre types les plus fréquemment détectés chez des femmes canadiennes avec des lésions de grade CIN1 à 3 (Castle et al., 2010; Coutlee et al., 2011; Munoz et al., 2003; Smith et al., 2007). D'après de Sanjosé et al., il se classe au 5^{ème} rang mondialement en termes de prévalence chez les femmes sans anomalie cytologique au niveau du col utérin (de Sanjose et al., 2007). Le VPH52 est prédominant avec le VPH16, le VPH18 et le VPH58 dans les populations asiatiques et celles d'Afrique de l'Est (Chen et al., 2011a; de Sanjose et al., 2007; Huang et al., 1997). Notre étude portait sur 3614 femmes, dont 216 positives pour le VPH52 dans au moins un spécimen, ce qui correspond à 6.0% des femmes de l'étude. Cette prévalence d'infection est semblable à celle rapportée par d'autres études réalisées sur le VPH52. Notamment, l'étude effectuée par Aho et al. au Canada a rapporté que 7.1% des

femmes séronégatives pour le VIH étaient positives pour le VPH52 (Aho et al., 2003; Ding et al., 2010).

À ce jour, quelques équipes seulement ont examiné le polymorphisme du VPH52. En revanche, le polymorphisme du VPH16 a été étudié plus en profondeur. Ces études ont permis de décrire les variations présentes dans différentes régions du génome viral et d'établir la phylogénie des variantes décrites. De ce fait, les isolats de VPH16 sont répartis en 5 branches phylogénétiques représentant chacune une région géographique (E, AA, As, Af1 et Af2) (Villa et al., 2000). Il a été prouvé que les variantes du VPH16 ont des propriétés biologiques et biochimiques différentes *in vitro*. De plus, les variantes non-prototypiques du VPH16 sont associées avec la persistance de l'infection à long terme (Londesborough et al., 1996; Xi et al., 2006) ainsi qu'avec un risque plus élevé d'apparition de CIN2,3 ou de cancer du col de l'utérus (Giannoudis and Herrington, 2001; Nindl, 2002; Villa et al., 2000; Xi et al., 1997).

En ce qui concerne le VPH52, plusieurs équipes de recherche ont décrit les variantes de ce type ainsi que sa phylogénie (Aho et al., 2003; Calleja-Macias et al., 2005; Ding et al., 2010; Gagnon et al., 2007; Xin et al., 2001). Néanmoins, peu d'études ont aussi examiné l'association du polymorphisme du VPH52 avec le développement de lésions CIN2,3 ou de cancer du col de l'utérus, qui est le sujet de l'étude présentée ici. En 2001, une étude réalisée par Xin et al. n'a pu démontrer l'existence d'une telle association, tandis que récemment, Chang et al. ont établi que des variantes de la lignée phylogénétique C sont associées avec la présence de CIN3 dans une population de femmes asiatiques (Chang et al., 2011; Xin et al., 2001). Une étude réalisée précédemment dans notre laboratoire avait permis de démontrer l'association entre le polymorphisme du LCR du VPH52 et la persistance de l'infection chez des femmes infectées ou à risque d'infection par le VIH (Aho et al., 2004). Or la persistance est un marqueur prédictif du développement de lésions de haut-grade, la persistance précédant l'apparition des lésions (Bodily and Laimins, 2011). Ainsi dans la continuité de l'étude précédente, notre projet avait pour but de confirmer si des variantes du VPH52 au niveau du LCR et/ou du gène E6, dans une population de femmes canadiennes, étaient associées avec la présence de lésions précancéreuses CIN2,3 ou de cancer invasif du col utérin.

La région régulatrice virale et le gène E6 ont été choisis pour les analyses de polymorphisme car la première est une région plus variable donc plus propice à l'apparition de mutations et qui régule l'activité transcriptionnelle virale. Or, les variations du LCR peuvent modifier la réplication et la transcription virale en éliminant, créant ou modifiant l'affinité de liaison de facteurs cellulaire ou viraux (E2) avec le LCR. Le gène E6, quant à lui, est un des oncogènes majeurs du virus et des variations pourraient agir sur sa liaison avec la protéine p53, capable d'induire l'apoptose. Des mutations dans ces régions pourraient donc influencer sur le potentiel oncogène des variantes.

1. Polymorphisme de la région régulatrice virale (LCR)

Pour une illustration du LCR et de la liaison des facteurs de transcription se référer à la figure 4, page 15

Des mutations sont plus fréquemment détectées dans les régions non-codantes plus variables des génomes viraux, comme le LCR. Par ce fait, un changement de nucléotide dans une région régulatrice aura un risque plus faible d'affecter l'activité du génome viral. Par contre, certaines variations ou certaines combinaisons de variations peuvent affecter la liaison de facteurs de transcription viraux (E2) ou cellulaires avec le LCR.

Il a déjà été démontré que le polymorphisme des VPH16, 18 et 33 est associé avec un plus grand risque d'infection persistante (Gagnon et al., 2004; Xi et al., 2006) mais aussi avec la présence de lésions de haut-grade (Khouadri et al., 2006; Villa et al., 2000; Xi et al., 1997). Nous avons investigué si des variantes du LCR du VPH52 étaient liées à un risque accru de développer des lésions de haut-grade. Pour cela, nous avons séquencé et analysé un fragment de 500 pb du LCR de spécimens obtenus de femmes ayant différents grades de lésions du col utérin. En accord avec d'autres publications, nous avons retrouvé dans le LCR de multiples variations nucléotidiques, dont des substitutions, des insertions et des délétions. Seuls douze échantillons n'ont pas pu être amplifiés ou

seulement partiellement amplifiés pour le LCR. Nous avons pu décrire 35 variantes du LCR du VPH52, incluant le prototype. Certaines de ces variantes avaient déjà été observées dans une étude précédente (MTL-52-LCR-02 à MTL-52-LCR-24) (Aho et al., 2003) alors que d'autres variantes sont nouvellement décrites (MTL-52-LCR-28 à MTL-52-LCR-50). La variante du LCR la plus fréquente fut le prototype. La majorité des variations observées pourraient entraîner une modification de liaison des facteurs de transcription à leurs sites putatifs d'interaction. Tout comme dans l'étude de Aho et al., la variation la plus fréquemment rencontrée se situait au niveau du nucléotide 7624. Cette variation provoque la perte d'un site de liaison pour le facteur C/EBP (Heinemeyer et al., 1998). Or ce facteur agit comme un répresseur de la transcription des gènes E6 et E7 pour les VPH16 et 11 (Liu et al., 2002; Wang et al., 1996). Il a été démontré que cette variation provoquant la perte du site de liaison du facteur C/EBP était associée avec la persistance de l'infection par le VPH52 (Aho et al., 2004). Dans notre étude, cette mutation ne semble pas impliquée dans le développement de lésions de haut-grade.

Concernant le potentiel oncogène des variantes du LCR, il semblerait que la variante MTL-52-LCR-02, possédant une seule substitution au niveau du nucléotide 7436, soit associée avec la présence de cancer du col utérin. Cette substitution entraîne l'ajout d'un site de liaison pour le facteur SRY (Heinemeyer et al., 1998). Or, le facteur SRY étant codé par le gène Y, il ne sera pas codé chez les femmes. Ainsi dans notre étude, ce facteur ne peut pas avoir d'influence sur la transcription des gènes viraux. En revanche, une étude réalisée chez des hommes, pourrait nous permettre d'investiguer si cette variante du VPH52 est associée avec la présence de lésions anales de haut-grade (AIN2,3). De plus, cette substitution entraîne l'ajout d'un site de liaison putatif pour le facteur NIT2 (Heinemeyer et al., 1998). Son rôle sur la transcription du VPH n'a jamais été décrit dans la littérature. Il est possible que la liaison de ce facteur interfère avec la liaison d'un autre facteur qui réprimait le LCR. Il est également possible que cette variation n'ait pas de rôle en soi mais co-ségrège avec d'autres mutations dans d'autres régions du génome viral. Il est à noter que, dans notre étude, le faible nombre de femmes atteintes d'un cancer du col utérin ne permettait pas de procéder à une analyse multivariée pour contrôler pour les facteurs confondants.

Deux variations étaient significativement associées avec une lésion CIN2,3, soit une délétion de trois nucléotides au niveau des positions 7695-7697 et la substitution d'une thymine pour une cytosine au niveau du nucléotide 7744. Ces deux mutations co-ségrégent et sont associées avec la présence de CIN2,3. Étant donnée leur co-ségrégation, on ne peut établir si ces variations sont associées avec la présence de lésions CIN2,3 indépendamment l'une de l'autre. La mutation au niveau du nucléotide 7744 entraîne la création d'un site de liaison pour le facteur cellulaire Oct-1 (Heinemeyer et al., 1998). Oct-1 pourrait agir comme un activateur indirect de la transcription du VPH16 en stabilisant la liaison du LCR avec un facteur nucléaire cellulaire (O'Connor and Bernard, 1995). Son rôle sur la transcription du VPH52 n'a jamais été décrit. La délétion du nucléotide 7695 provoque, quant à elle, la perte d'un site de liaison putatif pour le complexe activateur Fos/Jun, nommé AP-1 (Heinemeyer et al., 1998). Or d'autres études ont démontré que ce complexe est impliqué dans la carcinogénèse puisqu'il favorise l'activation de la transcription des gènes viraux, notamment des oncogènes E6 et E7 (Chan et al., 1990). Il est donc surprenant que la variante intra-typique possédant la délétion 7695 soit associée avec un CIN2,3. Plusieurs explications sont possibles. Dans cette région du LCR, plusieurs sites de liaison putatifs pour AP-1 se chevauchent. Ainsi la perte d'un de ces sites pourrait être compensée par la présence d'un autre site non muté. De plus, ces sites sont putatifs, ce qui signifie qu'il est possible qu'il n'y est pas de liaison du complexe AP-1 à ce site. La perte de ce site pourrait même augmenter l'affinité de liaison d'AP-1 avec un ou plusieurs des autres sites de liaison non mutés à proximité par une diminution de l'encombrement stérique. De même, il faut envisager que ces mutations du LCR co-ségrégent avec d'autres variations situées dans d'autres régions du génome viral non-étudiées ici, comme l'oncogène E7 ou le gène E2. Ces différentes hypothèses pourraient être explorées en vérifiant *in vitro* la liaison d'AP-1 sur les séquences prototypiques et mutées du LCR du VPH52. Ces mutations pourraient être introduites par mutagénèse dirigée. Le génome complet des isolats de VPH52 portant cette mutation pourrait être séquencé pour déterminer la présence de variations dans les autres gènes du VPH52. L'impact fonctionnel de ces autres mutations pourrait alors être évalué *in vitro* en vérifiant l'activité transcriptionnelle des différents LCR mutés.

De plus, d'autres études épidémiologiques devront être réalisées en recrutant des femmes d'âge et d'ethnicité diverses, pour confirmer la présence des variations du LCR décrites chez des femmes présentant des lésions de grade CIN2,3 ou un cancer du col de l'utérus.

2. Polymorphisme de l'oncogène E6

L'étude du polymorphisme de E6 est importante car des mutations non-synonymes peuvent modifier la fonction de la protéine codée par ce gène et influencer sur sa capacité à dégrader p53. De ce fait, les variantes intra-typiques du gène E6 pourraient ne pas avoir le même effet sur la prolifération cellulaire, et donc présenter un risque différent pour le développement de lésions. Il est déjà établi que les variantes du gène E6 du VPH16 ont des fonctions biologiques différentes (Lichtig et al., 2006; Stoppler et al., 1996). Certaines de ces variantes ont été associées avec la présence de lésions de haut-grade ou de cancer du col utérin. Cependant, plusieurs études ont échoué à prouver ce lien (Hu et al., 2001; Luxton et al., 2000). Le rôle du polymorphisme du gène E6 du VPH16 reste donc controversé. En effet, le polymorphisme viral est associé avec l'ethnie des participantes et son association avec la maladie peut être variable entre les populations.

Pour investiguer le lien entre les mutations du gène E6 du VPH52 et l'apparition de lésions du col utérin, nous avons amplifié et séquencé le gène en entier. La séquence de E6 n'a pu être analysée pour onze isolats. Pour le gène E6, nous avons décrit 17 variantes incluant le prototype. La plupart de ces variantes avait déjà été recensées lors de précédentes études (MTL-52-E6-01 à -16 et MTL-52-E6-20), mais cinq nouvelles variantes furent observées (MTL-52-E6-17 à -19 et MTL-52-E6-21 à -22) (Aho et al., 2003). Comme pour le LCR, la variante la plus souvent retrouvée pour le gène E6 fut le prototype. Pour les variantes non-prototypiques, six des mutations retrouvées étaient non-synonymes et provoquaient un changement d'acide aminé (E14D, H24D, L83V, V92L, K93R, S97G). Il est à noter qu'aucune insertion ou délétion n'a été observée dans le gène E6, ce qui est en accord avec les autres études réalisées sur le polymorphisme du gène E6 pour plusieurs types, dont le VPH52 (Aho et al., 2003; Ding et al., 2010). Certaines des

variations décrites pour le VPH52 avaient déjà été découvertes pour d'autres types de VPHs. Ainsi, la variante L83V a été décrite pour le VPH16 et le VPH33. Elle pourrait être associée avec la persistance de l'infection par le VPH16 ainsi qu'avec la présence de lésions de haut-grade (Grodzki et al., 2006; Zehbe et al., 1998). Dans notre étude précédente sur le VPH52, des variations au niveau du nucléotide 350 (aa83) étaient fréquemment retrouvées, en accord avec les études réalisées sur le VPH52 dans des populations asiatiques. Cependant, ces études n'ont pas mis en évidence une influence particulière de cette variante sur la persistance de l'infection par le VPH52 ou le développement de lésions de haut-grade (Aho et al., 2003; Aho et al., 2004; Chang et al., 2011; Ding et al., 2010). Ces résultats sont concordants avec les résultats obtenus dans notre étude actuelle, qui conclut que la mutation L83V n'était pas associée avec la présence de CIN2,3.

Dans l'étude actuelle, la mutation H24D de la protéine E6 était la plus fréquente. Seule la mutation K93R fut associée avec la présence de lésions CIN2,3. La variation K93N de la protéine E6 du VPH52 est très fréquemment retrouvée chez les femmes asiatiques (98% à 100% des variantes détectées selon les études) (Chang et al., 2011; Ding et al., 2010). La forte prévalence de cette variation dans ces populations ne permet donc pas d'étudier son rôle potentiel dans l'apparition de lésions de haut-grade puisque la majorité des femmes avec ou sans lésion sont infectées par des variantes ayant cette variation. On retrouve également aussi cette mutation au niveau de E6 du VPH58. Ding et al. ont démontré que cette variation est détectée dans 75% des cas de cancer invasif et des lésions CIN de tout grade. Ainsi, ils n'ont pu prouver que cette mutation était associée avec la présence de cancer invasif causé par le VPH58 (Ding et al., 2010). Le site compris entre les acides aminés 82 à 94 de E6 est le site putatif de liaison à la protéine p53, nécessaire pour sa dégradation (Aho et al., 2003). Or la mutation K93R se retrouve dans cette région et pourrait par conséquent modifier l'affinité de liaison à p53 et sa capacité à dégrader p53. L'étude réalisée par Chang et al. est en contradiction avec ses résultats, puisque les variantes de la lignée C du VPH52, ne possédant pas la mutation K93N, y étaient associées avec la présence de lésions CIN3, en comparaison avec les variantes de la lignée B, qui pourtant présentent pour la plupart la mutation K93N (Chang et al., 2011). L'ethnie prédominante de l'étude de Chang et al. est l'ethnie asiatique. Or, cette

mutation est très répandue chez les femmes asiatiques. Par contre, dans notre étude, les femmes caucasiennes sont prédominantes. Il se pourrait donc que la variation K93R puisse être plus carcinogène chez les femmes caucasiennes que chez les femmes asiatiques.

Des études *in vitro* de dégradation de p53 par des protéines E6 mutées devront être effectuées pour déterminer l'effet de la mutation K93R. D'autres études épidémiologiques devraient aussi être effectuées pour confirmer l'association entre cette variation et une lésion CIN2,3, en Europe ou en Amérique, cette variation étant trop fréquente en Asie pour être étudiée.

3. Phylogénie et ethnicité

À partir des séquences décrites pour les variantes du LCR du VPH52, un arbre phylogénétique a été généré. Plusieurs branches dont A (A1 et A2), B, C et D sont décrites pour le type 52 (Calleja-Macias et al., 2005; Chang et al., 2011; Chen et al., 2011b). Plusieurs branches ont aussi été décrites pour d'autres types génétiquement apparentés au VPH52 comme le VPH16 (5 branches : E, AA, As, Afr-1 et -2), le VPH31 (3 branches : A, B, C), le VPH33, (3 branches : A1, A2, B), le VPH35 (2 branches : A1, A2) et le VPH58 (Calleja-Macias et al., 2005; Chen et al., 2011b).

Dans l'étude actuelle, on observe une association entre le polymorphisme du LCR et l'origine ethnique, le prototype étant plus souvent retrouvé chez les femmes caucasiennes (lignée A2). Les femmes Inuit étaient infectées uniquement par les variantes de la lignée A2 et plus particulièrement par le prototype. Notre étude est la première à rapporter le polymorphisme du VPH52 dans la population des femmes Inuit. Les variantes infectant les femmes Inuit sont similaires aux variantes infectant les femmes caucasiennes (lignée A2) plutôt qu'aux variantes infectant les femmes asiatiques. En effet, d'après Chang et al., les variantes des lignées B et C prédominent dans les populations asiatiques (Chang et al., 2011). Or, la population Inuit a des origines asiatiques. En effet, la théorie initiale concernant la migration des Inuit propose qu'ils auraient traversé le détroit de Béring, venant d'Asie, pour s'installer en Amérique du

Nord. Or, certains spécialistes ont remis en question cette thèse et proposent que les populations Inuit auraient migrés en 3 vagues, dont deux à partir de l'Asie et une à partir de l'Europe, par bateau ou via des routes glaciaires (BBC Two and Douglas W., 2004; Dennis Stanford and Bruce Bradley, 2000). Ainsi, la présence de ces variantes chez les femmes Inuit pourrait nous indiquer les flux migratoires qui ont eu lieu il y a des milliers d'années. Il reste possible que les femmes Inuit aient été infectées plus récemment par des caucasiens venus d'Europe. Afin de tester ces deux possibilités, il serait intéressant d'étudier les variantes des autres génotypes de VPH présentes chez les femmes Inuit pour déterminer si cela est limité au VPH52 uniquement. De plus, investiguer les marqueurs génétiques de la population Inuit de l'Est pourrait nous indiquer si ceux-ci sont plus proches des populations caucasiennes ou asiatiques. Nous pourrions également étudier, les populations Inuit de l'Ouest pour déterminer si ces deux populations ont les mêmes origines génétiques.

L'ethnicité est reconnue comme un facteur pouvant jouer un rôle dans la susceptibilité au cancer du col utérin. Dans notre étude, en considérant l'ensemble des cohortes, l'ethnicité fut significativement associée avec les lésions de grade CIN2,3 (OR 0.3, 95% CI 0.2-0.6) (données non publiées). Ainsi 93% (60/64) des femmes avec CIN2,3 étaient caucasiennes versus 63% (47/75) des femmes sans lésion. À l'inverse, 7% des femmes (4/64) avec CIN2,3 n'étaient pas caucasiennes versus 37% (28/75) des femmes sans lésion ($p=0.001$) (données non publiées).

4. Cofacteurs (âge/tabac/persistance/infections par de multiples types)

De nombreuses études réalisées pour différents types de VPH, ont conclu que l'âge, le tabagisme, ainsi que la persistance de l'infection sont des facteurs indépendants pour la progression de la maladie.

Dans notre étude, l'âge fut associé de façon significative et indépendante avec la présence de lésions CIN2,3 ainsi qu'avec le cancer du col utérin. Les femmes plus âgées ont un risque accru de développer des lésions de haut-grade comparativement aux femmes plus jeunes. Cette différence de risque s'explique par le fait que l'évolution de la

maladie se fait sur une période de 10 à 20 ans après le début de l'infection par le papillomavirus (Alain et al., 2010). En revanche, le tabagisme et l'infection par plusieurs types de VPH ne furent pas significativement associés avec la présence de CIN2,3 dans notre étude (données non publiées). Le faible nombre de participantes explique en partie ces résultats. En effet, les ratios de cote étaient élevés mais les intervalles de confiance de 95% étaient importants, ce qui rendait l'association non-significative.

Contrairement à ce qui avait été trouvé dans notre étude précédente des femmes à risque d'infection ou infectées par le VIH, le polymorphisme du VPH52 ne fut pas associé avec la présence d'une infection persistante dans une population de femmes avec des lésions du col utérin. Ceci est en partie dû au manque de données pour certaines patientes de l'étude, notamment pour les femmes Inuit, pour lesquelles réaliser un suivi sur le long terme s'avérerait plus difficile. Le nombre de participantes avec une infection persistante en fut donc très réduit et notre étude manquait de puissance pour l'étude de ce paramètre.

5. Limitations de l'étude et résolution

Notre étude comportait certaines limitations, notamment le faible nombre de femmes présentant un cancer, ce qui restreignait l'analyse de l'association du polymorphisme du VPH52 avec la présence de cancer du col utérin. Cependant, le nombre plus important de femmes présentant des lésions CIN2,3 nous a permis de conclure à l'association positive du polymorphisme avec la présence de lésions précancéreuses de haut-grade, ce qui était notre but. Considérant que le recrutement de participantes variait selon l'étude, nous avons restreint notre analyse sur l'association du polymorphisme du VPH52 et CIN2,3 aux participantes d'études cas-contrôle et avons contrôlé pour le site de recrutement par analyse multivariée. De plus, plusieurs femmes du groupe contrôle n'ont été évaluées que par la cytologie. Pour diminuer l'impact de résultats faussement négatifs par la cytologie pour un CIN, les participantes étaient incluses dans le groupe contrôle en présence de plusieurs cytologies normales. Également, toutes les HSIL détectées en cytologie ont été confirmées par histologie. Il est important de réaliser que seulement le tiers des femmes VPH52-positives n'étaient

infectées que par ce type alors que les autres femmes étaient infectées par d'autres types en présence de VPH52. Cependant, l'analyse multivariée a contrôlé pour la présence des types oncogènes les plus fréquents, le VPH16 et VPH18. Il reste difficile d'exclure un rôle des autres types de VPH dans la pathologie observée. Ainsi, nous ne pouvons déterminer si le polymorphisme du VPH52 agit directement sur la carcinogénèse ou comme cofacteur en présence d'autres VPHs oncogènes. Ces possibilités pourraient être investiguées en analysant les biopsies au lieu des prélèvements de cellules exfoliées du col utérin, ce qui diminuerait le nombre de types détectés et permettrait une meilleure analyse du type causant la lésion.

Conclusion

Cette étude avait pour but de définir le polymorphisme du VPH52, et de voir si certaines des variantes étaient associées avec des lésions CIN2,3 ou avec le cancer du col utérin. Plusieurs études ont été réalisées sur le polymorphisme du VPH52, mais globalement seules des études effectuées sur des populations asiatiques avaient investigué la relation entre les variantes et la présence de lésions précancéreuses de haut-grade ou de cancer.

Ce projet réalisée chez des femmes d'ethnies diverses mais à majorité caucasiennes a permis de démontrer que le polymorphisme du LCR et du gène E6 du VPH52 est associé à la présence de CIN2,3 et possiblement au cancer du col de l'utérus. C'est aussi le tout premier rapport sur le polymorphisme du VPH52 des femmes d'origine Inuit. Une variante du LCR, MTL-52-LCR-02, présentant une mutation au niveau nucléotide 7436, serait associée avec la présence de cancer du col de l'utérus. Ce résultat devrait être confirmé dans une étude avec un nombre plus élevé de cas de cancer causé par le VPH52. En ce qui concerne le gène E6, aucune variation ne fut associée avec la présence de cancer du col utérin. Deux substitutions nucléotidiques présentes dans le LCR du VPH52 au niveau des nucléotides 7695 et 7744 augmenteraient, quant à elles, le risque de CIN2,3, tout comme la variante K93R de la protéine E6. Il a été confirmé que les cofacteurs de l'hôte, l'âge et l'ethnie jouent un rôle important dans la carcinogénèse du col utérin. Seule l'association entre le polymorphisme du VPH52 et la présence d'une infection persistante n'a pas été retrouvée dans cette étude, contrairement à ce qu'il avait été découvert dans l'étude précédente dans la continuité de laquelle s'inscrit ce projet. Ce résultat pourrait s'expliquer par le manque d'information sur la durée de l'infection au VPH52 chez certaines femmes de l'étude, et le faible nombre de femmes ayant développé une infection persistante.

Pour la suite, d'autres recherches devront être effectuées dans des cohortes de femmes présentant un taux d'infection au VPH52 plus important, d'âge et d'ethnies

diverses afin de confirmer les résultats obtenus. L'analyse de variantes du génome complet du VPH52 permettrait de voir si les mutations retrouvées dans le LCR ou le gène E6 ne co-ségrégent pas avec des variations dans d'autres gènes du génome viral, cela pour confirmer l'effet direct du polymorphisme du LCR et du gène E6 sur la réplication ou l'expression des variantes du type 52. De plus, une analyse fonctionnelle *in vitro* de la variante de la protéine E6 contenant la mutation K93R est à prévoir pour investiguer le mécanisme par lequel cette variante est associée avec la présence de lésions CIN2,3 du col utérin.

Reference List

- Aho,J., Hankins,C., Tremblay,C., Forest,P., Pourreaux,K., Rouah,F., and Coutlee,F. (2004). Genomic polymorphism of human papillomavirus type 52 predisposes toward persistent infection in sexually active women. *J. Infect. Dis.* *190*, 46-52.
- Aho,J., Hankins,C., Tremblay,C., Lang,F., Forest,P., Pourreaux,K., Rouah,F., and Coutlee,F. (2003). Molecular analysis of human papillomavirus type 52 isolates detected in the genital tract of human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. *J. Infect. Dis.* *188*, 1517-1527.
- Alain,S., Hantz,S., and Denis,F. (2010). Papillomavirus : les virus et la physiopathologie de l'infection. *mt pédiatrie* *13*, 5-19.
- Apgar,B.S., Zoschnick,L., and Wright,T.C., Jr. (2003). The 2001 Bethesda System terminology. *Am. Fam. Physician* *68*, 1992-1998.
- Appleby,P., Beral,V., Berrington de,G.A., Colin,D., Franceschi,S., Goodhill,A., Green,J., Peto,J., Plummer,M., and Sweetland,S. (2007). Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* *370*, 1609-1621.
- Apt,D., Chong,T., Liu,Y., and Bernard,H.U. (1993). Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* *67*, 4455-4463.
- Ashrafi,G.H., Brown,D.R., Fife,K.H., and Campo,M.S. (2006). Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res.* *120*, 208-211.
- Ashrafi,G.H., Tsirimonaki,E., Marchetti,B., O'Brien,P.M., Sibbet,G.J., Andrew,L., and Campo,M.S. (2002). Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* *21*, 248-259.
- Balmelli,C., Roden,R., Potts,A., Schiller,J., De,G.P., and Nardelli-Haeffliger,D. (1998). Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions. *J. Virol.* *72*, 8220-8229.
- Barrett ,T.J., Silbar ,J.D., and McGinley ,J.P. (1954). Genital warts-a venereal disease. *J. Am. Med. Assoc.* *154*, 333-334.
- Barrios,K. and Celis,E. (2012). TriVax-HPV: an improved peptide-based therapeutic vaccination strategy against human papillomavirus-induced cancers. *Cancer Immunol. Immunother.*
- Baseman,J.G. and Koutsky,L.A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J. Clin. Virol.* *32 Suppl 1*, S16-S24.

Bauknecht,T., Jundt,F., Herr,I., Oehler,T., Delius,H., Shi,Y., Angel,P., and zur,H.H. (1995). A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J. Virol.* 69, 1-12.

BBC Two and Douglas W. *Stone Age Columbus - programme summary*, <http://www.bbc.co.uk/science/horizon/2002/columbus.shtml>, page consultée pour la dernière fois le 02 août 2012. 2004.

Ref Type: Online Source

Beagley,K.W. and Gockel,C.M. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 13-22.

Benedet, J. L., Pecorelli, S., Ngan, H. Y., and Hacker, N. F. Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecological Cancers, Chapter 3 Cancer of the cervix uteri. [3ème édition], 37-62. 2006.

Ref Type: Online Source

Bergstrom,R., Sparen,P., and Adami,H.O. (1999). Trends in cancer of the cervix uteri in Sweden following cytological screening. *Br. J. Cancer* 81, 159-166.

Bernard,H.U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32 *Suppl 1*, S1-S6.

Bernard,H.U., Burk,R.D., Chen,Z., van,D.K., Hausen,H., and de Villiers,E.M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70-79.

Bernard,H.U., Calleja-Macias,I.E., and Dunn,S.T. (2006). Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer* 118, 1071-1076.

Blachon,S. and Demeret,C. (2003). The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie* 85, 813-819.

Bleul,C., Muller,M., Frank,R., Gausepohl,H., Koldovsky,U., Mgaya,H.N., Luande,J., Pawlita,M., ter,M.J., Viscidi,R., and . (1991). Human papillomavirus type 18 E6 and E7 antibodies in human sera: increased anti-E7 prevalence in cervical cancer patients. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1579-1588.

Bodily,J. and Laimins,L.A. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* 19, 33-39.

Bontkes,H.J., de Gruijl,T.D., Walboomers,J.M., van den Muysenberg,A.J., Gunther,A.W., Scheper,R.J., Meijer,C.J., and Kummer,J.A. (1997). Assessment of cytotoxic T-lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA-1 in cervical neoplastic lesions. *Br. J. Cancer* 76, 1353-1360.

Bousarghin,L., Touze,A., Sizaret,P.Y., and Coursaget,P. (2003). Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol.* 77, 3846-3850.

Bouvard,V., Baan,R., Straif,K., Grosse,Y., Secretan,B., El Ghissassi,F.B.-T.L.G.N.F.C.G.L.C.V., and WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. (2009). A review of human carcinogens--Part B : biological agents. *Lancet Oncol.* 10, 321-322.

Bouvard,V., Matlashewski,G., Gu,Z.M., Storey,A., and Banks,L. (1994). The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* 203, 73-80.

Bravo,I.G., de,S.S., and Gottschling,M. (2010). The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends Microbiol.* 18, 432-438.

Bryan,J.T. and Brown,D.R. (2001). Transmission of human papillomavirus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 281, 35-42.

Burk,R.D., Chen,Z., and van,D.K. (2009). Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics* 12, 281-290.

Burk,R.D., Ho,G.Y., Beardsley,L., Lempa,M., Peters,M., and Bierman,R. (1996). Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J. Infect. Dis.* 174, 679-689.

Calleja-Macias,I.E., Villa,L.L., Prado,J.C., Kalantari,M., Allan,B., Williamson,A.L., Chung,L.P., Collins,R.J., Zuna,R.E., Dunn,S.T., Chu,T.Y., Cubie,H.A., Cuschieri,K., von Knebel-Doeberitz,M., Martins,C.R., Sanchez,G.I., Bosch,F.X., Munoz,N., and Bernard,H.U. (2005). Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* 79, 13630-13640.

Campo,M.S., Graham,S.V., Cortese,M.S., Ashrafi,G.H., Araibi,E.H., Dornan,E.S., Miners,K., Nunes,C., and Man,S. (2010). HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology* 407, 137-142.

Carcopino,X., Bolger,N., Henry,M., Mancini,J., Boubli,L., Olive,D., Cleary,S., Prendiville,W., and Tamalet,C. (2011). Evaluation of type-specific HPV persistence and high-risk HPV viral load quantitation in HPV positive women under 30 with normal cervical cytology. *J. Med. Virol.* 83, 637-643.

Castellsague,X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 110, S4-S7.

Castellsague,X. and Munoz,N. (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* 20-28.

- Castle,P.E., Schiffman,M., Wheeler,C.M., Wentzensen,N., and Gravitt,P.E. (2010). Human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *19*, 1675-1681.
- Cento,V., Ciccozzi,M., Ronga,L., Perno,C.F., and Ciotti,M. (2009). Genetic diversity of human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 genes in Italian women with different grades of cervical lesions. *J. Med. Virol.* *81*, 1627-1634.
- Cento,V., Rahmatalla,N., Ciccozzi,M., Lo,P.A., Perno,C.F., and Ciotti,M. (2012). Human papillomaviruses 53 and 66: clinical aspects and genetic analysis. *Virus Res.* *163*, 212-222.
- Cento,V., Rahmatalla,N., Ciccozzi,M., Perno,C.F., and Ciotti,M. (2011). Intratype variations of HPV 31 and 58 in Italian women with abnormal cervical cytology. *J. Med. Virol.* *83*, 1752-1761.
- Chan,P.K., Lam,C.W., Cheung,T.H., Li,W.W., Lo,K.W., Chan,M.Y., Cheung,J.L., and Cheng,A.F. (2002). Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 1249-1253.
- Chan,W.K., Chong,T., Bernard,H.U., and Klock,G. (1990). Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res.* *18*, 763-769.
- Chang,Y.J., Chen,H.C., Lee,B.H., You,S.L., Lin,C.Y., Pan,M.H., Chou,Y.C., Hsieh,C.Y., Chen,Y.M., Cheng,Y.J., and Chen,C.J. (2011). Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. *Int. J. Cancer* *129*, 965-973.
- Chen,H.C., You,S.L., Hsieh,C.Y., Schiffman,M., Lin,C.Y., Pan,M.H., Chou,Y.C., Liaw,K.L., Hsing,A.W., and Chen,C.J. (2011a). Prevalence of genotype-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Taiwan: a community-based survey of 10,602 women. *Int. J. Cancer* *128*, 1192-1203.
- Chen,Z., Schiffman,M., Herrero,R., Desalle,R., Anastos,K., Segondy,M., Sahasrabudde,V.V., Gravitt,P.E., Hsing,A.W., and Burk,R.D. (2011b). Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS. One.* *6*, e20183.
- Chopra,K.F. and Tying,S.K. (1997). The impact of the human immunodeficiency virus on the human papillomavirus epidemic. *Arch. Dermatol.* *133*, 629-633.
- Chuang,L.C., Hu,C.Y., Chen,H.C., Lin,P.J., Lee,B., Lin,C.Y., Pan,M.H., You,S.L., Hsieh,C.Y., and Chen,C.J. (2012). Associations of human leukocyte antigen class II genotypes with human papillomavirus 18 infection and cervical intraepithelial neoplasia risk. *Cancer* *118*, 223-231.

Coleman,N., Birley,H.D., Renton,A.M., Hanna,N.F., Ryait,B.K., Byrne,M., Taylor-Robinson,D., and Stanley,M.A. (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am. J. Clin. Pathol.* 102, 768-774.

Comité Consultatif National de l'Immunisation (CCNI). *Mise à jour sur les vaccins contre le virus du papillome humain (VPH)*, page consultée pour la dernière fois le 30 juillet 2012. Relevé des maladies transmissibles au Canada 38. 2012.

Ref Type: Online Source

Cornut,G., Gagnon,S., Hankins,C., Money,D., Pourreaux,K., Franco,E.L., and Coutlee,F. (2010). Polymorphism of the capsid L1 gene of human papillomavirus types 31, 33, and 35. *J. Med. Virol.* 82, 1168-1178.

Coutlee,F., Ratnam,S., Ramanakumar,A.V., Insinga,R.R., Bentley,J., Escott,N., Ghatage,P., Koushik,A., Ferenczy,A., and Franco,E.L. (2011). Distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Canada. *J. Med. Virol.* 83, 1034-1041.

Cuiffo,G. (1907). Positive transfer with a filtrate of the common wart. *Gior Ital D Mal Ven* 48, 12-17.

Culp,T.D. and Christensen,N.D. (2004). Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* 319, 152-161.

Daling,J.R., Sherman,K.J., and Weiss,N.S. (1986). Risk factors for condyloma acuminatum in women. *Sex Transm. Dis.* 13, 16-18.

Davy,C.E., Jackson,D.J., Raj,K., Peh,W.L., Southern,S.A., Das,P., Sorathia,R., Laskey,P., Middleton,K., Nakahara,T., Wang,Q., Masterson,P.J., Lambert,P.F., Cuthill,S., Millar,J.B., and Doorbar,J. (2005). Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J. Virol.* 79, 3998-4011.

Day,P.M., Baker,C.C., Lowy,D.R., and Schiller,J.T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 14252-14257.

Day,P.M., Lowy,D.R., and Schiller,J.T. (2008). Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J. Virol.* 82, 12565-12568.

de Freitas,A.C., Gurgel,A.P., Chagas,B.S., Coimbra,E.C., and do Amaral,C.M. (2012). Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecol. Oncol.*

de Sanjose,S., Diaz,M., Castellsague,X., Clifford,G., Bruni,L., Munoz,N., and Bosch,F.X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 453-459.

- de Villiers,E.M., Fauquet,C., Broker,T.R., Bernard,H.U., and zur,H.H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- Deacon,J.M., Evans,C.D., Yule,R., Desai,M., Binns,W., Taylor,C., and Peto,J. (2000). Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br. J. Cancer* 83, 1565-1572.
- Deluca,G.D., Basiletti,J., Schelover,E., Vasquez,N.D., Alonso,J.M., Marin,H.M., Lucero,R.H., and Picconi,M.A. (2011). Chlamydia trachomatis as a probable cofactor in human papillomavirus infection in aboriginal women from northeastern Argentina. *Braz. J. Infect. Dis.* 15, 567-572.
- Demeret,C., Desaintes,C., Yaniv,M., and Thierry,F. (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71, 9343-9349.
- Dennis Stanford and Bruce Bradley. *Constructing the Solutrean Solution*, page consultée pour la dernière fois le 02 août 2012, <http://www.clovisinthesoutheast.net/stanford.html>. Scientific American: Discovering Archaeology [The leach, El paso, Texas]. 2000.
Ref Type: Online Source
- Ding,T., Wang,X., Ye,F., Cheng,X., Ma,D., Lu,W., and Xie,X. (2010). Distribution of human papillomavirus 58 and 52 E6/E7 variants in cervical neoplasia in Chinese women. *Gynecol. Oncol.* 119, 436-443.
- Doorbar,J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* 32 Suppl 1, S7-15.
- Doorbar,J., Ely,S., Sterling,J., McLean,C., and Crawford,L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827.
- Durst,M., Gissmann,L., Ikenberg,H., and zur,H.H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 3812-3815.
- Ellis,J.R., Keating,P.J., Baird,J., Hounsell,E.F., Renouf,D.V., Rowe,M., Hopkins,D., Duggan-Keen,M.F., Bartholomew,J.S., Young,L.S., and . (1995). The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat. Med.* 1, 464-470.
- Evander,M., Frazer,I.H., Payne,E., Qi,Y.M., Hengst,K., and McMillan,N.A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* 71, 2449-2456.
- Ferber,M.J., Thorland,E.C., Brink,A.A., Rapp,A.K., Phillips,L.A., McGovern,R., Gostout,B.S., Cheung,T.H., Chung,T.K., Fu,W.Y., and Smith,D.I. (2003). Preferential

integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 22, 7233-7242.

Ferlay,J., Shin,H.R., Bray,F., Forman,D., Mathers,C., and Parkin,D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893-2917.

Finlay,M., Yuan,Z., Burden,F., Trawford,A., Morgan,I.M., Campo,M.S., and Nasir,L. (2009). The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus Res.* 144, 315-317.

Finnen,R.L., Erickson,K.D., Chen,X.S., and Garcea,R.L. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 77, 4818-4826.

Flores,R., Papenfuss,M., Klimecki,W.T., and Giuliano,A.R. (2006). Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* 118, 1187-1193.

Florin,L., Becker,K.A., Lambert,C., Nowak,T., Sapp,C., Strand,D., Streeck,R.E., and Sapp,M. (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *J. Virol.* 80, 6691-6696.

Fonseca-Moutinho,J.A. (2011). Smoking and cervical cancer. *ISRN. Obstet. Gynecol.* 2011, 847684.

Forouzanfar,M.H., Foreman,K.J., Delossantos,A.M., Lozano,R., Lopez,A.D., Murray,C.J., and Naghavi,M. (2011). Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 378, 1461-1484.

Franco,E.L. (2009). Bernard Duval: the architect of Quebec's HPV immunization programme. *Public Health Genomics* 12, 261-263.

Franco,E.L., Villa,L.L., Sobrinho,J.P., Prado,J.M., Rousseau,M.C., Desy,M., and Rohan,T.E. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* 180, 1415-1423.

Fрати,E., Bianchi,S., Colzani,D., Zappa,A., Orlando,G., and Tanzi,E. (2011). Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). *Infect. Genet. Evol.* 11, 2119-2124.

Gagnon,S., Hankins,C., Money,D., Pourreaux,K., Franco,E., and Coutlee,F. (2007). Polymorphism of the L1 capsid gene and persistence of human papillomavirus type 52 infection in women at high risk or infected by HIV. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 44, 61-65.

- Gagnon,S., Hankins,C., Tremblay,C., Forest,P., Pourreaux,K., and Coutlee,F. (2004). Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. *J. Infect. Dis.* *190*, 1575-1585.
- Galloway,D.A. (1992). Serological assays for the detection of HPV antibodies. *IARC Sci. Publ.* 147-161.
- Garcia-Closas,R., Castellsague,X., Bosch,X., and Gonzalez,C.A. (2005). The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int. J. Cancer* *117*, 629-637.
- Gheit,T., Cornet,I., Clifford,G.M., Iftner,T., Munk,C., Tommasino,M., and Kjaer,S.K. (2011). Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *20*, 1315-1321.
- Giannoudis,A., Duin,M., Snijders,P.J., and Herrington,C.S. (2001). Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br. J. Cancer* *84*, 1058-1063.
- Giannoudis,A. and Herrington,C.S. (2001). Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J. Pathol.* *193*, 295-302.
- Gissmann,L. and zur,H.H. (1976). Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *73*, 1310-1313.
- Giuliano,A.R., Siegel,E.M., Roe,D.J., Ferreira,S., Baggio,M.L., Galan,L., Duarte-Franco,E., Villa,L.L., Rohan,T.E., Marshall,J.R., and Franco,E.L. (2003). Dietary intake and risk of persistent human papillomavirus (HPV) infection: the Ludwig-McGill HPV Natural History Study. *J. Infect. Dis.* *188*, 1508-1516.
- Graham,D.A. and Herrington,C.S. (2000). HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol. Pathol.* *53*, 201-206.
- Gravitt,P.E. and Jamshidi,R. (2005). Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* *19*, 439-458.
- Gravitt,P.E., Kovacic,M.B., Herrero,R., Schiffman,M., Bratti,C., Hildesheim,A., Morales,J., Alfaro,M., Sherman,M.E., Wacholder,S., Rodriguez,A.C., and Burk,R.D. (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int. J. Cancer* *121*, 2787-2793.
- Gregor,P.D., Sawadogo,M., and Roeder,R.G. (1990). The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev.* *4*, 1730-1740.

- Greslin,I., Mougin,C., and Seilles,E. (1998). [The biology of papillomavirus infections. III. Immune response]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 56, 267-276.
- Grodzki,M., Besson,G., Clavel,C., Arslan,A., Franceschi,S., Birembaut,P., Tommasino,M., and Zehbe,I. (2006). Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 820-822.
- Guess,J.C. and McCance,D.J. (2005). Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3alpha production. *J. Virol.* 79, 14852-14862.
- Hariri,S., Unger,E.R., Sternberg,M., Dunne,E.F., Swan,D., Patel,S., and Markowitz,L.E. (2011). Prevalence of genital human papillomavirus among females in the United States, the National Health And Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *J. Infect. Dis.* 204, 566-573.
- Harper,D.M., Franco,E.L., Wheeler,C., Ferris,D.G., Jenkins,D., Schuind,A., Zahaf,T., Innis,B., Naud,P., De Carvalho,N.S., Roteli-Martins,C.M., Teixeira,J., Blatter,M.M., Korn,A.P., Quint,W., and Dubin,G. (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 364, 1757-1765.
- Hebner,C.M. and Laimins,L.A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* 16, 83-97.
- Heinemeyer,T., Wingender,E., Reuter,I., Hermjakob,H., Kel,A.E., Kel,O.V., Ignatieva,E.V., Ananko,E.A., Podkolodnaya,O.A., Kolpakov,F.A., Podkolodny,N.L., and Kolchanov,N.A. (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 26, 362-367.
- Hemann,M.T. and Lowe,S.W. (2006). The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death. Differ.* 13, 1256-1259.
- Herrero,R., Hildesheim,A., Bratti,C., Sherman,M.E., Hutchinson,M., Morales,J., Balmaceda,I., Greenberg,M.D., Alfaro,M., Burk,R.D., Wacholder,S., Plummer,M., and Schiffman,M. (2000). Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 464-474.
- Hildesheim,A., Herrero,R., Castle,P.E., Wacholder,S., Bratti,M.C., Sherman,M.E., Lorincz,A.T., Burk,R.D., Morales,J., Rodriguez,A.C., Helgesen,K., Alfaro,M., Hutchinson,M., Balmaceda,I., Greenberg,M., and Schiffman,M. (2001a). HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br. J. Cancer* 84, 1219-1226.
- Hildesheim,A., Schiffman,M., Bromley,C., Wacholder,S., Herrero,R., Rodriguez,A., Bratti,M.C., Sherman,M.E., Scarpidis,U., Lin,Q.Q., Terai,M., Bromley,R.L., Buetow,K.,

- Apple, R.J., and Burk, R.D. (2001b). Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 315-318.
- Hildesheim, A. and Wang, S.S. (2002). Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res.* *89*, 229-240.
- Ho, L., Chan, S.Y., Burk, R.D., Das, B.C., Fujinaga, K., Icenogle, J.P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P., and . (1993). The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J. Virol.* *67*, 6413-6423.
- Hoppe-Seyler, F. and Butz, K. (1992). Activation of human papillomavirus type 18 E6-E7 oncogene expression by transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Res.* *20*, 6701-6706.
- Horvath, C.A., Boulet, G.A., Renoux, V.M., Delvenne, P.O., and Bogers, J.P. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol. J.* *7*, 11.
- Hu, T., Ferril, S., Snider, A., and Barbosa, M. (1995). In-vivo analysis of hpv e7 protein association with prb, p107 and p130. *Int. J. Oncol.* *6*, 167-174.
- Hu, X., Pang, T., Guo, Z., Mazurenko, N., Kisseljov, F., Ponten, J., and Nister, M. (2001). HPV16 E6 gene variations in invasive cervical squamous cell carcinoma and cancer in situ from Russian patients. *Br. J. Cancer* *84*, 791-795.
- Huang, C.F., Monie, A., Weng, W.H., and Wu, T. (2010). DNA vaccines for cervical cancer. *Am. J. Transl. Res.* *2*, 75-87.
- Huang, S., Afonina, I., Miller, B.A., and Beckmann, A.M. (1997). Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int. J. Cancer* *70*, 408-411.
- Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J.Y., Libermann, T.A., Jin, J., Harper, J.W., and Munger, K. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Virol.* *81*, 9737-9747.
- Hwang, J.H., Lee, J.K., Kim, T.J., and Kim, M.K. (2010). The association between fruit and vegetable consumption and HPV viral load in high-risk HPV-positive women with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Causes Control* *21*, 51-59.
- Ishii, Y., Ozaki, S., Tanaka, K., and Kanda, T. (2005). Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. *Virus Genes* *31*, 321-328.
- Jackson, M.E., Pennie, W.D., McCaffery, R.E., Smith, K.T., Grindlay, G.J., and Campo, M.S. (1991). The B subgroup bovine papillomaviruses lack an identifiable E6 open reading frame. *Mol. Carcinog.* *4*, 382-387.

Jackson,S., Harwood,C., Thomas,M., Banks,L., and Storey,A. (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* *14*, 3065-3073.

Josefsson,A.M., Magnusson,P.K., Ylitalo,N., Sorensen,P., Qwarforth-Tubbin,P., Andersen,P.K., Melbye,M., Adami,H.O., and Gyllensten,U.B. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* *355*, 2189-2193.

Kahn,J.A., Rosenthal,S.L., Succop,P.A., Ho,G.Y., and Burk,R.D. (2002). Mediators of the association between age of first sexual intercourse and subsequent human papillomavirus infection. *Pediatrics* *109*, E5.

Kammer,C., Warthorst,U., Torrez-Martinez,N., Wheeler,C.M., and Pfister,H. (2000). Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J. Gen. Virol.* *81*, 1975-1981.

Kamper,N., Day,P.M., Nowak,T., Selinka,H.C., Florin,L., Bolscher,J., Hilbig,L., Schiller,J.T., and Sapp,M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J. Virol.* *80*, 759-768.

Kanodia,S., Fahey,L.M., and Kast,W.M. (2007). Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr. Cancer Drug Targets.* *7*, 79-89.

Kawana,Y., Kawana,K., Yoshikawa,H., Taketani,Y., Yoshiike,K., and Kanda,T. (2001). Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J. Virol.* *75*, 2331-2336.

Khan,M.J., Castle,P.E., Lorincz,A.T., Wacholder,S., Sherman,M., Scott,D.R., Rush,B.B., Glass,A.G., and Schiffman,M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl. Cancer Inst.* *97*, 1072-1079.

Khouadri,S., Villa,L.L., Gagnon,S., Koushik,A., Richardson,H., Ferreira,S., Tellier,P., Simao,J., Matlashewski,G., Roger,M., Franco,E.L., and Coutlee,F. (2006). Human papillomavirus type 33 polymorphisms and high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J. Infect. Dis.* *194*, 886-894.

Khouadri,S., Villa,L.L., Gagnon,S., Koushik,A., Richardson,H., Matlashewski,G., Roger,M., Ferenczy,A.S., Franco,E.L., and Coutlee,F. (2007). Viral load of episomal and integrated forms of human papillomavirus type 33 in high-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Int. J. Cancer* *121*, 2674-2681.

Kim,J.W., Song,S.H., Jin,C.H., Lee,J.K., Lee,N.W., and Lee,K.W. (2012). Factors affecting the clearance of highrisk human papillomavirus infection and the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Int. Med. Res.* *40*, 486-496.

- Kim,M.K., Kim,H.S., Kim,S.H., Oh,J.M., Han,J.Y., Lim,J.M., Juhnn,Y.S., and Song,Y.S. (2010). Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 1930-1935.
- Kirnbauer,R., Booy,F., Cheng,N., Lowy,D.R., and Schiller,J.T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 12180-12184.
- Kirnbauer,R., Taub,J., Greenstone,H., Roden,R., Durst,M., Gissmann,L., Lowy,D.R., and Schiller,J.T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J. Virol.* *67*, 6929-6936.
- Knowles,G., O'Neil,B.W., and Campo,M.S. (1996). Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J. Virol.* *70*, 8451-8458.
- Kyo,S., Klumpp,D.J., Inoue,M., Kanaya,T., and Laimins,L.A. (1997). Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J. Gen. Virol.* *78 (Pt 2)*, 401-411.
- Lehman,C.W. and Botchan,M.R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 4338-4343.
- Lehoux,M., D'Abramo,C.M., and Archambault,J. (2009). Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics* *12*, 268-280.
- Lehtinen,M., Koskela,P., Jellum,E., Bloigu,A., Anttila,T., Hallmans,G., Luukkaala,T., Thoresen,S., Youngman,L., Dillner,J., and Hakama,M. (2002). Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: a longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *Am. J. Epidemiol.* *156*, 687-692.
- Ley,C., Bauer,H.M., Reingold,A., Schiffman,M.H., Chambers,J.C., Tashiro,C.J., and Manos,M.M. (1991). Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J. Natl. Cancer Inst.* *83*, 997-1003.
- Li,M., Beard,P., Estes,P.A., Lyon,M.K., and Garcea,R.L. (1998). Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* *72*, 2160-2167.
- Li,Y., Li,Z., He,Y., Kang,Y., Zhang,X., Cheng,M., Zhong,Y., and Xu,C. (2009). Phylogeographic analysis of human papillomavirus 58. *Sci. China C. Life Sci.* *52*, 1164-1172.
- Li,Y.L., Qiu,X.H., Shen,C., Liu,J.N., and Zhang,J. (2010). Vaccination of full-length HPV16 E6 or E7 protein inhibits the growth of HPV16 associated tumors. *Oncol. Rep.* *24*, 1323-1329.

- Lichtig,H., Algrisi,M., Botzer,L.E., Abadi,T., Verbitzky,Y., Jackman,A., Tommasino,M., Zehbe,I., and Sherman,L. (2006). HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology* 350, 216-227.
- Liu,S., Semenciw,R., and Mao,Y. (2001). Cervical cancer: the increasing incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women. *CMAJ*. 164, 1151-1152.
- Liu,Y., Li,J.Z., Yuan,X.H., Adler-Storthz,K., and Che,Z. (2002). An AP-1 binding site mutation in HPV-16 LCR enhances E6/E7 promoter activity in human oral epithelial cells. *Virus Genes* 24, 29-37.
- Londesborough,P., Ho,L., Terry,G., Cuzick,J., Wheeler,C., and Singer,A. (1996). Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int. J. Cancer* 69, 364-368.
- Longatto-Filho,A., Hammes,L.S., Sarian,L.O., Roteli-Martins,C., Derchain,S.F., Erzen,M., Branca,M., Tatti,S., Naud,P., de Matos,J.C., Gontijo,R., Maeda,M.Y., Lima,T., Costa,S., Syrjanen,S., and Syrjanen,K. (2011). Hormonal contraceptives and the length of their use are not independent risk factors for high-risk HPV infections or high-grade CIN. *Gynecol. Obstet. Invest* 71, 93-103.
- Luxton,J., Mant,C., Greenwood,B., Derias,N., Nath,R., Shepherd,P., and Cason,J. (2000). HPV16 E6 oncogene variants in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J. Med. Virol.* 60, 337-341.
- Maciag,P.C., Schlecht,N.F., Souza,P.S., Rohan,T.E., Franco,E.L., and Villa,L.L. (2002). Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. *J. Infect. Dis.* 186, 164-172.
- Mahata,S., Bharti,A.C., Shukla,S., Tyagi,A., Husain,S.A., and Das,B.C. (2011). Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Mol. Cancer* 10, 39.
- Markowitz,L.E., Dunne,E.F., Saraiya,M., Lawson,H.W., Chesson,H., and Unger,E.R. (2007). Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* 56, 1-24.
- Massimi,P., Gammoh,N., Thomas,M., and Banks,L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 23, 8033-8039.
- Matthews,K., Leong,C.M., Baxter,L., Inglis,E., Yun,K., Backstrom,B.T., Doorbar,J., and Hibma,M. (2003). Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J. Virol.* 77, 8378-8385.

May,P. and May E. (1998). Protéine p53 : de l'interaction avec les protéines virales à la pathogénie des cancers humains. *Virologie* 2, 347-354.

McCredie,M.R., Sharples,K.J., Paul,C., Baranyai,J., Medley,G., Jones,R.W., and Skegg,D.C. (2008). Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 9, 425-434.

Melikian,A.A., Sun,P., Prokopczyk,B., El-Bayoumy,K., Hoffmann,D., Wang,X., and Waggoner,S. (1999). Identification of benzo[a]pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Lett.* 146, 127-134.

Michelin,D., Gissmann,L., Street,D., Potkul,R.K., Fisher,S., Kaufmann,A.M., Qiao,L., and Schreckenberger,C. (1997). Regulation of human papillomavirus type 18 in vivo: effects of estrogen and progesterone in transgenic mice. *Gynecol. Oncol.* 66, 202-208.

Monsonogo,J. (2006). *Infections génitales à HPV. Bases fondamentales*. In "*Infections à papillomavirus. Etat des connaissances, pratiques et prévention vaccinale*", (Paris: Springer-Verlag France), pp. 3-27.

Monsonogo,J. (2007). *Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus*. (Paris: Springer-Verlag France).

Moscicki,A.B., Winkler,B., Irwin,C.E., Jr., and Schachter,J. (1989). Differences in biologic maturation, sexual behavior, and sexually transmitted disease between adolescents with and without cervical intraepithelial neoplasia. *J. Pediatr.* 115, 487-493.

Mougin,C., Bernard,B., and Lab,M. (1997). [Biology of papillomavirus infections. I. General characteristics]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 55, 555-563.

Mougin,C., Bourgault-Villada,I., and Coursaget,P. (2009). [HPV immunization for the prevention of cervical cancer]. *Presse Med.* 38, 1750-1768.

Munday,J.S., Hanlon,E.M., Howe,L., Squires,R.A., and French,A.F. (2007). Feline cutaneous viral papilloma associated with human papillomavirus type 9. *Vet. Pathol.* 44, 924-927.

Munger,K. (2002). The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci.* 7, d641-d649.

Munoz,N., Bosch,F.X., Castellsague,X., Diaz,M., de,S.S., Hammouda,D., Shah,K.V., and Meijer,C.J. (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer* 111, 278-285.

Munoz,N., Bosch,F.X., de,S.S., Herrero,R., Castellsague,X., Shah,K.V., Snijders,P.J., and Meijer,C.J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518-527.

Munoz,N., Bosch,F.X., de,S.S., Tafur,L., Izarzugaza,I., Gili,M., Viladiu,P., Navarro,C., Martos,C., Ascunce,N., and . (1992). The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer* 52, 743-749.

Munoz,N., Castellsague,X., de Gonzalez,A.B., and Gissmann,L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 *Suppl* 3, S3-1-S310.

Munoz,N., Franceschi,S., Bosetti,C., Moreno,V., Herrero,R., Smith,J.S., Shah,K.V., Meijer,C.J., and Bosch,F.X. (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359, 1093-1101.

National Cancer Institute (NCI). *HPV Vaccine Study in Costa Rica Yields Insights on Cancer Prevention*, page consultée pour la dernière fois le 01 août 2012. NCI Cancer Bulletin Volume 8 Number 18. 2011a.

Ref Type: Online Source

National Cancer Institute (NCI). *Trial Confirms Efficacy of HPV Vaccine, Shows Cross-Protection*. NCI Cancer Bulletin Volume 8 Number 23. 2011b.

Ref Type: Online Source

Nees,M., Geoghegan,J.M., Hyman,T., Frank,S., Miller,L., and Woodworth,C.D. (2001). Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J. Virol.* 75, 4283-4296.

Negrini,B.P., Schiffman,M.H., Kurman,R.J., Barnes,W., Lannom,L., Malley,K., Brinton,L.A., Delgado,G., Jones,S., Tchabo,J.G., and . (1990). Oral contraceptive use, human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. *Cancer Res.* 50, 4670-4675.

Nindl, I. HPV Variants and Risk of Cervical Cancer. 13[1], 1-6. 2002. Papillomavirus Report.

Ref Type: Report

Nonnenmacher,M., Salmon,J., Jacob,Y., Orth,G., and Breitburd,F. (2006). Cottontail rabbit papillomavirus E8 protein is essential for wart formation and provides new insights into viral pathogenesis. *J. Virol.* 80, 4890-4900.

O'Brien,V. and Campo,M.S. (1998). BPV-4 E8 transforms NIH3T3 cells, up-regulates cyclin A and cyclin A-associated kinase activity and de-regulates expression of the cdk inhibitor p27Kip1. *Oncogene* 17, 293-301.

O'Connor,M. and Bernard,H.U. (1995). Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* 207, 77-88.

O'Connor,M., Chan,S.Y., and Bernard,H.U. (1995). Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. In Human Papillomaviruses., G.Meyers, H.Delius, J.Icenogle, H.U.Bernard, C.C.Baker, A.L.Halpern, and C.Wheeler, eds. (Los Alamos, N. Mex.: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory), p. III-21-III-40.

O'Connor,M.J., Tan,S.H., Tan,C.H., and Bernard,H.U. (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J. Virol.* 70, 6529-6539.

Ong,C.K., Chan,S.Y., Campo,M.S., Fujinaga,K., Mavromara-Nazos,P., Labropoulou,V., Pfister,H., Tay,S.K., ter,M.J., Villa,L.L., and . (1993). Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J. Virol.* 67, 6424-6431.

Orth,G., Favre,M., and Croissant,O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J. Virol.* 24, 108-120.

Otten,N., von,T.C., Lazary,S., Antczak,D.F., and Gerber,H. (1993). DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Arch. Virol.* 132, 121-131.

Palefsky,J.M. (1998). Human papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* 15-20.

Pande,S., Jain,N., Prusty,B.K., Bhambhani,S., Gupta,S., Sharma,R., Batra,S., and Das,B.C. (2008). Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1060-1066.

Pennie,W.D., Grindlay,G.J., Cairney,M., and Campo,M.S. (1993). Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology* 193, 614-620.

Plummer,M., Herrero,R., Franceschi,S., Meijer,C.J., Snijders,P., Bosch,F.X., de,S.S., and Munoz,N. (2003). Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case--control study. *Cancer Causes Control* 14, 805-814.

Prokopczyk,B., Cox,J.E., Hoffmann,D., and Waggoner,S.E. (1997). Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 868-873.

Quint,K.D., de Koning,M.N., van Doorn,L.J., Quint,W.G., and Pirog,E.C. (2010). HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 117, 297-301.

Ramanakumar,A.V., Goncalves,O., Richardson,H., Tellier,P., Ferenczy,A., Coutlee,F., and Franco,E.L. (2010). Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC. Infect. Dis.* 10, 326.

Richards,R.M., Lowy,D.R., Schiller,J.T., and Day,P.M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 1522-1527.

Richardson,H., Kelsall,G., Tellier,P., Voyer,H., Abrahamowicz,M., Ferenczy,A., Coutlee,F., and Franco,E.L. (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *12*, 485-490.

Roberts,S., Kingsbury,S.R., Stoeber,K., Knight,G.L., Gallimore,P.H., and Williams,G.H. (2008). Identification of an arginine-rich motif in human papillomavirus type 1 E1;E4 protein necessary for E4-mediated inhibition of cellular DNA synthesis in vitro and in cells. *J. Virol.* *82*, 9056-9064.

Robl,M.G. and Olson,C. (1968). Oncogenic action of bovine papilloma virus in hamsters. *Cancer Res.* *28*, 1596-1604.

Rodriguez,A.C., Schiffman,M., Herrero,R., Wacholder,S., Hildesheim,A., Castle,P.E., Solomon,D., and Burk,R. (2008). Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J. Natl. Cancer Inst.* *100*, 513-517.

Rohan,T., Mann,V., McLaughlin,J., Harnish,D.G., Yu,H., Smith,D., Davis,R., Shier,R.M., and Rawls,W. (1991). PCR-detected genital papillomavirus infection: prevalence and association with risk factors for cervical cancer. *Int. J. Cancer* *49*, 856-860.

Rous,P. and Beard,J.W. (1935). The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J. Exp. Med.* *62*, 523-548.

Santé Canada. *Dépistage du cancer du col de l'utérus*, page consultée pour la dernière fois le 26 juillet 2012. 2005.

Ref Type: Online Source

Sasagawa,T., Tani,M., Basha,W., Rose,R.C., Tohda,H., Giga-Hama,Y., Azar,K.K., Yasuda,H., Sakai,A., and Inoue,M. (2005). A human papillomavirus type 16 vaccine by oral delivery of L1 protein. *Virus Res.* *110*, 81-90.

Sastre-Garau,X., Loste,M.N., Vincent-Salomon,A., Favre,M., Mouret,E., de la Rochefordiere,A., Durand,J.C., Tartour,E., Lepage,V., and Charron,D. (1996). Decreased frequency of HLA-DRB1 13 alleles in Frenchwomen with HPV-positive carcinoma of the cervix. *Int. J. Cancer* *69*, 159-164.

Scheffner,M., Huibregtse,J.M., Vierstra,R.D., and Howley,P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* *75*, 495-505.

Scheffner,M., Werness,B.A., Huibregtse,J.M., Levine,A.J., and Howley,P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136.

Schiffman,M., Rodriguez,A.C., Chen,Z., Wacholder,S., Herrero,R., Hildesheim,A., Desalle,R., Befano,B., Yu,K., Safaeian,M., Sherman,M.E., Morales,J., Guillen,D., Alfaro,M., Hutchinson,M., Solomon,D., Castle,P.E., and Burk,R.D. (2010). A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res.* 70, 3159-3169.

Schiffman,M., Wentzensen,N., Wacholder,S., Kinney,W., Gage,J.C., and Castle,P.E. (2011). Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 368-383.

Schiffman,M.H., Bauer,H.M., Hoover,R.N., Glass,A.G., Cadell,D.M., Rush,B.B., Scott,D.R., Sherman,M.E., Kurman,R.J., Wacholder,S., and . (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 958-964.

Schlecht,N.F., Kulaga,S., Robitaille,J., Ferreira,S., Santos,M., Miyamura,R.A., Duarte-Franco,E., Rohan,T.E., Ferenczy,A., Villa,L.L., and Franco,E.L. (2001). Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 286, 3106-3114.

Scully,R.E., Bonfiglio,T.A., Kurman,R.J., Silverberg,S.G., and Wilkerson,E.J. (1994). Histological typing of female genital tract tumors. In WHO. World Health Organization. International histological classification of tumors., (Berlin: Springer-Verlag), pp. 39-54.

Selinka,H.C., Giroglou,T., Nowak,T., Christensen,N.D., and Sapp,M. (2003). Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J. Virol.* 77, 12961-12967.

Sethi,S., Muller,M., Schneider,A., Blettner,M., Smith,E., Turek,L., Wahrendorf,J., Gissmann,L., and Chang-Claude,J. (1998). Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178, 360-364.

Shope,R.E. and Hurst,E.W. (1933). Infectious papillomatosis of rabbits : with a note on the histopathology. *J. Exp. Med.* 58, 607-624.

Sibbet,G.J., Cuthill,S., and Campo,M.S. (1995). The enhancer in the long control region of human papillomavirus type 16 is up-regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1. *J. Virol.* 69, 4006-4011.

Sichero,L., Ferreira,S., Trottier,H., Duarte-Franco,E., Ferenczy,A., Franco,E.L., and Villa,L.L. (2007). High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int. J. Cancer* 120, 1763-1768.

Sichero,L., Franco,E.L., and Villa,L.L. (2005). Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J. Infect. Dis.* *191*, 739-742.

Smith,J.S., Lindsay,L., Hoots,B., Keys,J., Franceschi,S., Winer,R., and Clifford,G.M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer* *121*, 621-632.

Société canadienne du cancer. Comité directeur de la Société canadienne du cancer : *Statistiques canadiennes sur le cancer 2011*, document consulté le 26 juillet 2012. Statistique Canada, Agence de la santé publique du Canada . 2011.

Ref Type: Online Source

Société canadienne du cancer. Encyclopédie canadienne du cancer : *Vue d'ensemble du cancer du col de l'utérus*, page consultée pour la dernière fois le 26 juillet 2012. 2012.

Ref Type: Online Source

Solomon,D., Davey,D., Kurman,R., Moriarty,A., O'Connor,D., Prey,M., Raab,S., Sherman,M., Wilbur,D., Wright,T., Jr., and Young,N. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* *287*, 2114-2119.

Stern,P.L., Faulkner,R., Veranes,E.C., and Davidson,E.J. (2001). The role of human papillomavirus vaccines in cervical neoplasia. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *15*, 783-799.

Stoppler,M.C., Ching,K., Stoppler,H., Clancy,K., Schlegel,R., and Icenogle,J. (1996). Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J. Virol.* *70*, 6987-6993.

Storey,A., Pim,D., Murray,A., Osborn,K., Banks,L., and Crawford,L. (1988). Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J.* *7*, 1815-1820.

Straight,S.W., Hinkle,P.M., Jewers,R.J., and McCance,D.J. (1993). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* *67*, 4521-4532.

Syrjanen,K., Hakama,M., Saarikoski,S., Vayrynen,M., Yliskoski,M., Syrjanen,S., Kataja,V., and Castren,O. (1990). Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm. Dis.* *17*, 15-19.

Syrjanen,S. and Syrjanen,K. (2008). The history of papillomavirus research. *Cent. Eur. J. Public Health* *16 Suppl*, S7-13.

Tabora,N., Ferrera,A., Bakkers,J.M., Massuger,L.F., and Melchers,W.J. (2008). High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *78*, 843-846.

- Tan,S.H., Leong,L.E., Walker,P.A., and Bernard,H.U. (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* 68, 6411-6420.
- Tran-Thanh,D., Provencher,D., Koushik,A., Duarte-Franco,E., Kessous,A., Drouin,P., Wheeler,C.M., Dubuc-Lissoir,J., Gauthier,P., Allaire,G., Vauclair,R., Dipaolo,J.A., Gravitt,P., Franco,E., and Coutlee,F. (2003). Herpes simplex virus type II is not a cofactor to human papillomavirus in cancer of the uterine cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188, 129-134.
- Trottier,H. and Burchell,A.N. (2009). Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics* 12, 291-307.
- Trottier,H. and Franco,E.L. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 *Suppl 1*, S1-15.
- Tungteakkhun,S.S. and Duerksen-Hughes,P.J. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch. Virol.* 153, 397-408.
- Vambutas,A., DeVoti,J., Pinn,W., Steinberg,B.M., and Bonagura,V.R. (2001). Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clin. Immunol.* 101, 94-99.
- Van,D.E., Oosthuizen,M.C., Bosman,A.M., Nel,P.J., Zimmerman,D., and Venter,E.H. (2009). Detection of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected and healthy free-roaming zebra (*Equus zebra*) populations in South Africa. *J. Virol. Methods* 158, 141-151.
- Veldman,T., Horikawa,I., Barrett,J.C., and Schlegel,R. (2001). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol.* 75, 4467-4472.
- Venuti,A., Paolini,F., Nasir,L., Corteggio,A., Roperto,S., Campo,M.S., and Borzacchiello,G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer* 10, 140.
- Villa,L.L., Bernard,H.U., Kast,M., Hildesheim,A., Amestoy,G., and Franco,E.L. (2002). Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference-HPV2001. *Virus Res.* 89, 163-173.
- Villa,L.L., Costa,R.L., Petta,C.A., Andrade,R.P., Ault,K.A., Giuliano,A.R., Wheeler,C.M., Koutsky,L.A., Malm,C., Lehtinen,M., Skjeldestad,F.E., Olsson,S.E., Steinwall,M., Brown,D.R., Kurman,R.J., Ronnett,B.M., Stoler,M.H., Ferenczy,A., Harper,D.M., Tamms,G.M., Yu,J., Lupinacci,L., Railkar,R., Taddeo,F.J., Jansen,K.U., Esser,M.T., Sings,H.L., Saah,A.J., and Barr,E. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a

randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6, 271-278.

Villa,L.L., Sichero,L., Rahal,P., Caballero,O., Ferenczy,A., Rohan,T., and Franco,E.L. (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* 81, 2959-2968.

Volpers,C., Unckell,F., Schirmacher,P., Streeck,R.E., and Sapp,M. (1995). Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J. Virol.* 69, 3258-3264.

Walboomers,J.M., Jacobs,M.V., Manos,M.M., Bosch,F.X., Kummer,J.A., Shah,K.V., Snijders,P.J., Peto,J., Meijer,C.J., and Munoz,N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12-19.

Wallin,K.L., Wiklund,F., Angstrom,T., Bergman,F., Stendahl,U., Wadell,G., Hallmans,G., and Dillner,J. (1999). Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 341, 1633-1638.

Wang,H., Liu,K., Yuan,F., Berdichevsky,L., Taichman,L.B., and Auborn,K. (1996). C/EBPbeta is a negative regulator of human papillomavirus type 11 in keratinocytes. *J. Virol.* 70, 4839-4844.

Wang,Y.W., Chang,H.S., Lin,C.H., and Yu,W.C. (2007). HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 402-412.

Wentzensen,N., Walker,J., Schiffman,M., Yang,H.P., Zuna,R.E., Dunn,S.T., Allen,R.A., Zhang,R., Sherman,M., Gold,M.A., and Wang,S.S. (2013). Heterogeneity of high-grade cervical intraepithelial neoplasia related to HPV16: Implications for natural history and management. *Int. J. Cancer* 132, 148-154.

Wheeler,C.M., Parmenter,C.A., Hunt,W.C., Becker,T.M., Greer,C.E., Hildesheim,A., and Manos,M.M. (1993). Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal women attending the University of New Mexico student health center. *Sex Transm. Dis.* 20, 286-289.

White,E. (1994). Tumour biology. p53, guardian of Rb. *Nature* 371, 21-22.

Wu,E.W., Clemens,K.E., Heck,D.V., and Munger,K. (1993). The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J. Virol.* 67, 2402-2407.

Xi,L.F., Kiviat,N.B., Hildesheim,A., Galloway,D.A., Wheeler,C.M., Ho,J., and Koutsky,L.A. (2006). Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1045-1052.

- Xi,L.F., Koutsky,L.A., Galloway,D.A., Kuypers,J., Hughes,J.P., Wheeler,C.M., Holmes,K.K., and Kiviat,N.B. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 796-802.
- Xin,C.Y., Matsumoto,K., Yoshikawa,H., Yasugi,T., Onda,T., Nakagawa,S., Yamada,M., Nozawa,S., Sekiya,S., Hirai,Y., Shiromizu,K., Fujii,T., and Taketani,Y. (2001). Analysis of E6 variants of human papillomavirus type 33, 52 and 58 in Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia/cervical cancer in relation to their oncogenic potential. *Cancer Lett.* 170, 19-24.
- Yang,L., Mohr,I., Fouts,E., Lim,D.A., Nohaile,M., and Botchan,M. (1993). The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 5086-5090.
- Zehbe,I., Mytilineos,J., Wikstrom,I., Henriksen,R., Edler,L., and Tommasino,M. (2003). Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum. Immunol.* 64, 538-542.
- Zehbe,I., Wilander,E., Delius,H., and Tommasino,M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 58, 829-833.
- Zhou,J., Doorbar,J., Sun,X.Y., Crawford,L.V., McLean,C.S., and Frazer,I.H. (1991). Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 185, 625-632.
- Zhou,J., Sun,X.Y., Louis,K., and Frazer,I.H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J. Virol.* 68, 619-625.
- Zimmermann,H., Degenkolbe,R., Bernard,H.U., and O'Connor,M.J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* 73, 6209-6219.
- zur Hausen,H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 36, 794.
- zur Hausen,H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78, 1-30.
- zur Hausen,H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2, 342-350.
- zur Hausen,H. (2006). *Papillomavirus Infections : A major Cause of Human Cancers*. In *Infections Causing Human Cancer*, (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA), pp. 145-243.